

ORSAY

Série A, n°

N° d'ordre :

49

T H E S E S

présentées

A L A F A C U L T E D E S S C I E N C E S

D ' O R S A Y

U N I V E R S I T E D E P A R I S

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université

par

Michel D R O S D O W S K Y

-----

1ère Thèse : Etude biochimique et métabolique des  
androgènes testiculaires

2ème Thèse : Propositions données par la Faculté

Soutenue le 10 Juin 1967 devant la Commission d'Examen

E. LEDERER : Président

:

M. FETIZON :

:

: Examineurs

M.F. JAYLE :



ORSAY

Série A, n°

N° d'ordre :

49

T H E S E S

présentées

A L A F A C U L T E D E S S C I E N C E S

D ' O R S A Y

U N I V E R S I T E D E P A R I S

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université

par

Michel D R O S D O W S K Y

-----

1ère Thèse : Etude biochimique et métabolique des  
androgènes testiculaires

2ème Thèse : Propositions données par la Faculté

Soutenue le 10 Juin 1967 devant la Commission d'Examen

E. LEDERER : Président

:

M. FETIZON :

:

: Examineurs

M.F. JAYLE :





A mes Maîtres, le Professeur M.F.JAYLE et  
le Professeur R.I.DORFMAN,

qui ont inspiré et dirigé ce travail, en témoignage  
de profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur  
LEDERER qui a bien voulu présider le jury de ma thèse.

J'adresse également mes remerciements à  
Monsieur le Professeur FETIZON, qui a accepté d'en  
être le rapporteur.

J'exprime toute ma reconnaissance à mes  
conseillers, les Docteurs E.FORCHIELLI, N.Mac NIVEN  
et R.SCHOLLER pour l'aide qu'ils m'ont apportée et à  
tous mes collaborateurs qui m'ont assisté dans mon  
travail, tout particulièrement les Docteurs FUTTERWEIT  
et LANTOS et Messieurs K.M.J.MENON et A.DESSYPRIS.



ETUDE BIOCHIMIQUE ET METABOLIQUE DES ANDROGENES TESTICULAIRES

Par

M. DROSDOWSKY



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41544305\\_0008](https://archive.org/details/IA41544305_0008)



## TABLEAU DES ABREVIATIONS

---

Cholestérol =  $3\beta$ -hydroxy-cholesta-5-ène

$20\alpha$ -hydroxycholestérol =  $3\beta, 20\alpha$ -dihydroxy-cholesta-5-ène

$20\alpha, 22$ -dihydroxycholestérol =  $3\beta, 20\alpha, 22$ -trihydroxy-cholesta-5-ène

Testostérone =  $17\beta$ -hydroxy-androsta-4-ène-3-one

Epitestostérone =  $17\alpha$ -hydroxy-androsta-4-ène-3-one

Androstènedione = androsta-4-ène-3,17-dione

Progestérone = pregna-4-ène-3,20-dione

$17\alpha$ -hydroxyprogestérone =  $17\alpha$ -hydroxy-pregna-4-ène-3-one

Prégnénolone =  $3\beta$ -hydroxy-pregna-5-ène-20-one

$17\alpha$ -hydroxyprégnénolone =  $3\beta, 17\alpha$ -dihydroxy-pregna-5-ène-20-one

Déhydroépiandrostérone (DHA) =  $3\beta$ -hydroxy-androsta-5-ène-17-one

$17\alpha$ -hydroxy- $20\beta$ -dihydroprogestérone =  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-pregna-4-ène-3-one

$20\beta$ -dihydroprogestérone =  $20\beta$ -hydroxy-pregna-4-ène-3-one

Androstérone =  $3\alpha$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane-17-one

Epandrostérone =  $3\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane-17-one

Étiocholanolone =  $3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -androstane-17-one

11-céto-androstérone =  $3\alpha$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane-11,17-dione

11-céto-étiocholanolone =  $3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -androstane-11,17-dione

11-hydroxy-étiocholanolone =  $3\alpha, 11\beta$ -dihydroxy- $5\beta$ -androstane-17-one

11-hydroxy-androstérone =  $3\alpha, 11\beta$ -dihydroxy- $5\alpha$ -androstane-17-one



HCG = gonadotropine chorionique humaine

FSH = hormone folliculo-stimulante

LH (ICSH) = hormone lutéinisante

$3\beta$ -hydroxystéroïde : NAD(P) =  $3\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase  
oxydo-réductase (E.C. 1.1.1.51)

$17\beta$ -hydroxystéroïde : NADP = testostérone- $17\beta$ -déshydrogénase  
 $17\beta$ -oxydo-réductase (E.C. 1.1.1.64)

Stéroïde, NADPH : oxygène = stéroïde  $17\alpha$ -hydroxylase  
oxydo-réductase (E.C. 1.14.1.7)  
( $17\alpha$ -hydroxylation)

$\beta$ -D-glucuronide glucuronohydrolase =  $\beta$ -glucuronidase  
(E.C. 3.2.1.31)

3 céto-stéroïde  $\Delta_4$ - $\Delta_5$ -isomérase = stéroïde  $\Delta$ -isomérase  
(E.C. 5.3.3.1)

NAD<sup>+</sup> (DPN<sup>+</sup>) = nicotinamide adenine dinucléotide oxydé

NADH (DPNH) = nicotinamide adenine dinucléotide réduit

NADP<sup>+</sup> (TPN<sup>+</sup>) = nicotinamide adenine dinucléotide phosphate oxydé

NADPH (TPNH) = nicotinamide adenine dinucléotide phosphate réduit

ATP = acide adenosine-triphosphorique

AMP cyclique = adenosine-3',5'-monophosphate

DDQ = 2,3-dichloro-5,6-dicyano-benzoquinone

d.p.m. = désintégrations par minute

c.p.m. = coups par minute

A.S. = activité spécifique

C.C.M. = chromatographie en couche mince



T.R.R. = temps de rétention relatif

mg = milligramme

µg = microgramme

ng = nanogramme

pg = picogramme





SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES SUR PAPIER

Heptane/méthanol-eau (50:40:10) (Bush A) (B.A.)

Ligroïne/propylène-glycol (L/P.G.)

Cyclohexane-benzène (1:1)/propylène-glycol (CH.B./P.G.)

Heptane-benzène/méthanol-eau (33:17:40:10) (Bush B3) (B3)

Hexane-benzène (1:1)/propylène-glycol (H.B./P.G.)



I

BIOGENESE DES ANDROGENES TESTICULAIRES





## I - BIOGENESE DES ANDROGENES TESTICULAIRES

---

### A) HISTORIQUE

La biogénèse des androgènes a d'abord été étudiée par des méthodes biologiques et chimiques, puis par détermination des stéroïdes de la veine spermatique et par perfusion du testicule avec des substances marquées ou non, et enfin au moyen de coupes et d'homogénats de tissu.

Nous mentionnerons brièvement les résultats obtenus par les premières méthodes pour insister tout particulièrement sur les expériences réalisées in vitro.

#### 1°) Mise en évidence des stéroïdes par des méthodes biologiques et chimiques.

Les premiers travaux démontrant la présence d'une activité hormonale testiculaire sont déjà fort anciens. Au début, les seules preuves apportées ont été biologiques. C'est ainsi que FELLNER (47), DOHRN (35), LAQUEUR et al. (98), MAC GEE (110), BROUHA et SIMONNET (14), ZONDEK (162) ont



démontré l'activité androgène et oestrogène des extraits testiculaires. En 1931, BUTENANDT (19) cristallise le premier androgène de l'urine et plus tard l'appelle androstérone. Cependant, il devint bientôt évident que ce composé différait biologiquement et chimiquement de l'hormone active du testicule. En 1935, DAVID et LAQUEUR (26) isolent cette hormone testiculaire à partir du testicule de taureau et l'appellent testostérone.

BUTENANDT et al. (20) en font la synthèse au cours de la même année.

Entre 1943 et 1947, RUZICKA et al. (127, 154) isolent la testostérone dans les testicules d'étalon et de porc.

En 1952, WEST et al. (161) isolent et identifient par spectrographie infrarouge la testostérone et l'androstènedione dans la veine spermatique du chien. LUCAS et al. (103), par une technique différente, (chromatographie sur papier, contre-courant et essais biologiques), démontrent la présence de testostérone dans le sang veineux spermatique humain et son absence dans le sang de l'artère spermatique. La testostérone est donc de toute évidence un véritable produit de sécrétion du testicule. Puis, ce stéroïde est identifié dans d'autres espèces animales.



LINDNER (101, 102) étudie la sécrétion d'androgènes par collection du sang veineux spermatique en fonction de l'âge chez les bovins et montre que chez le veau l'androstènedione (A) prédomine sur la testostérone (T) et que l'administration de HCG ne modifie pas sensiblement leur rapport ( $T/A = 0,7$ ). A partir de l'âge de trois mois, la testostérone devient prédominante et l'androstènedione tend progressivement à disparaître ( $T/A = 15$ ). Ce même auteur étudie la sécrétion d'androgène chez le bélier, le porc et l'étalon adultes et trouve là aussi une large prédominance de la testostérone sur l'androstènedione. La testostérone n'est pas détectable dans le sang artériel spermatique de ces animaux.

Plus récemment, SUZUKI et al. (151, 152, 153) ont caractérisé la testostérone et l'androstènedione dans le sang veineux spermatique du rat et ont montré l'élévation rapide du taux de ces stéroïdes après injection de HCG et leur disparition après hypophysectomie. Après hypophysectomie, la sécrétion n'est rétablie qu'après une stimulation par la gonadotropine chorionique pendant une période minimum de dix semaines.

Tous ces remarquables travaux ont été réalisés à partir de quantités importantes de glandes ou de sang et ont nécessité de laborieuses séparations chimiques et chromatographiques. L'emploi des radioisotopes a rendu ces recherches plus faciles et a permis d'élucider le métabolisme de la testostérone.





2°) Détermination des stéroïdes de la veine spermatique  
après perfusion de substances marquées.

Perfusant un testicule humain avec de l'acétate-1- $^{14}\text{C}$ , SAVARD et al. (134) mettent en évidence la production de testostérone et d'androstènedione. L'addition de HCG au liquide de perfusion double la radioactivité de la fraction neutre. Dans une expérience identique réalisée chez l'étalon, SAVARD et GOLDZIEHER (135) isolent les stéroïdes suivants sous forme radiochimiquement pure : androstènedione, testostérone, progestérone et 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone. La 11 $\beta$ -hydroxyandrostènedione ajoutée sous forme de "carrier" est isolée sans radioactivité, montrant l'absence d'une 11 $\beta$ -hydroxylase testiculaire.

EIK-NES et HALL (43) perfusant avec du cholestérol-4- $^{14}\text{C}$  des chiens anesthésiés isolent de la déhydroépiandrostérone marquée du sang veineux spermatique. HAGEN et EIK-NES (64) rapportent l'isolement de déhydroépiandrostérone, de 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, de testostérone et d'androstènedione marquées dans le sang veineux spermatique du chien après perfusion de 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone-7 $\alpha$ - $^3\text{H}$ . Néanmoins, la même expérience réalisée avec de la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone-4- $^{14}\text{C}$  aboutit à un résultat négatif.



3°) Etude du métabolisme des androgènes au moyen de coupes de tissu, d'homogénats et de fractions subcellulaires du testicule.

La première expérience de ce type fut réalisée en 1946 par BLOCH et al. (6). Incubant des testicules de rat en présence de deutéro-acétate, ces auteurs ne purent mettre en évidence la production de cholestérol marqué.

Néanmoins, quatre années plus tard, SRERE et al. (146) utilisant de l'acétate-<sup>14</sup>C isolent du cholestérol marqué après incubation dans des conditions sensiblement identiques.

C'est surtout à BRADY (9) que l'on doit le véritable essor des recherches sur le métabolisme testiculaire. Cet auteur incube des coupes de testicule humain, de porc, de lapin et de rat en présence d'acétate-<sup>14</sup>C en utilisant la testostérone comme "carrier" et en extrayant l'incubat selon la méthode de SAMUELS (130). La testostérone est localisée sur les chromatogrammes par son absorption dans l'ultra-violet, éluée et la radioactivité est mesurée. L'addition de gonadotropine chorionique élève le taux de conversion, mais sans modifier la radioactivité du cholestérol. La conversion reste très basse, la faible activité spécifique entraînant l'utilisation de quantités importantes de substrat et par là même une saturation



du système enzymatique. Cependant, la procédure employée reste criticable, l'auteur ne s'étant pas assuré de la constance de l'activité spécifique. Chez le rat, la testostérone s'est révélée dépourvue de radioactivité. L'auteur en conclut que les testicules humains, de porc et de lapin transforment l'acétate en cholestérol, puis en testostérone et que dans le cas du lapin la quantité de testostérone produite augmente par addition de HCG alors que la production de cholestérol n'est pas affectée, pouvant faire penser que le cholestérol n'est pas un précurseur nécessaire à la biosynthèse de la testostérone. En fait, une partie de ces conclusions a été infirmée par la suite; d'une part SUZUKI et al. (152) ont mis en évidence de la testostérone dans le sang veineux du rat, d'autre part, GOSPODAROWICZ et al. (61) s'appuyant sur les travaux de MOORE (115) ont montré, en incubant des testicules de rat en présence d'acétate marqué, que l'incorporation de la radioactivité dans le cholestérol augmentait en présence de HCG si l'incubation avait lieu à 27°C, température qui semble plus physiologique pour le testicule que celle de 37°C employée par BRADY (9). Cela n'a pas été confirmé par le récent travail de HALL (66) qui a montré que l'incorporation d'acétate-1-<sup>14</sup>C dans la testostérone est maximale à 38°C en présence de coupes de testicule de lapin. Enfin, MENON et DORFMAN (114) ont pu démontrer que le cholestérol était un intermédiaire nécessaire dans la biosynthèse de la testostérone.



SLAUNWHITE et SAMUELS (144) apportent une contribution importante à ces études métaboliques. En incubant des testicules de rats préalablement stimulés par la gonadotropine chorionique, ils montrent que la progestérone est un intermédiaire important dans la voie biosynthétique de la testostérone. D'autre part, après incubation avec de la progestérone-21-<sup>14</sup>C, ils montrent que 0,20 % de la radioactivité est récupéré sous forme d'acide formique radioactif. Ces travaux ont été confirmés par CARTENSEN (24) qui, en incubant des testicules humains et des testicules de rat en présence de 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, obtient de la testostérone et de l'androstènedione. KANHT et al. (85) mettent en évidence de la 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone et de la déhydroépiandrostérone marquées après incubation d'homogénats de testicules de taureau en présence de prégnénolone, montrant la possibilité d'une nouvelle voie métabolique. Enfin, SHIMIZU et al. (143) incubant un homogénat de testicule de rat en présence de 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol-22-<sup>14</sup>C, mettent en évidence de l'acide isocaproïque marqué. Il semble bien établi actuellement que le clivage de la chaîne latérale du cholestérol aboutit à la formation de prégnénolone d'une part et d'acide isocaproïque d'autre part (25). TOREN et al. (156) ont pu apporter chez le même animal les précisions suivantes : l'enzyme de clivage se trouve dans la fraction mitochondriale; la présence de cofacteur est nécessaire, celle de NADPH étant préférentielle et





le blocage de la cytochrome-oxydase par le cyanure augmente le clivage du cholestérol.

C'est à LYNN et BROWN (105) que l'on doit les premières recherches sur les fractions subcellulaires du testicule. Par incubation avec de la progestérone-4-<sup>14</sup>C de la fraction microsomiale des testicules de cobaye et de rat (ces derniers après stimulation par HCG in vivo), ces auteurs identifient dans l'incubat la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, la testostérone, l'androstènedione et la 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogestérone. Incubant de la progestérone-21-<sup>14</sup>C, ils démontrent aussi que la chaîne latérale de la progestérone peut donner un faible pourcentage d'acide acétique. La formation de ces différents stéroïdes met en jeu quatre enzymes : la testostérone 17 $\beta$ -déshydrogénase, surtout abondante chez le cobaye, la 17 $\alpha$ -hydroxylase, la 20 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase, responsable de la transformation de la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone en 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogestérone et l'enzyme de clivage ou desmolase. Néanmoins, si l'existence des deux premiers enzymes est incontestable, celle des deux derniers repose sur des critères beaucoup plus discutables. Leurs principales propriétés sont les suivantes : nécessité de NADPH pour les quatre enzymes et d'oxygène pour les deux derniers, stimulation par addition de cyanure comme dans les recherches effectuées par TOREN. Ces travaux ont été confirmés par SHIKITA et TAMAOKI (140) qui ont montré la



présence d'une 17 $\alpha$ -hydroxylase, d'une 17,20-desmolase et d'une testostérone-17 $\beta$ -déshydrogénase, enzymes contenus dans les microsomes. Le NADPH est le co-facteur nécessaire à toutes ces activités enzymatiques. L'addition du surnageant à 500.000 x g augmente de façon notable la production de stéroïdes en C<sub>19</sub> à partir de progestérone-4-<sup>14</sup>C et de 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone-4-<sup>14</sup>C. Incubant de la prégnénolone ou de la progestérone marquées en présence de microsomes, ces mêmes auteurs montrent que la progestérone est plus rapidement transformée en testostérone que ne l'est la prégnénolone et que l'androstènedione est un intermédiaire entre la progestérone et la testostérone aussi bien qu'entre la prégnénolone et la testostérone (142). Dans des expériences toutes récentes, les mêmes auteurs montrent que le surnageant présente aussi une activité 20 $\alpha$ -hydroxystéroïde-déshydrogénasique alors qu'elle est absente de la fraction microsomiale (141).

Cette activité enzymatique a été retrouvée dans les testicules de rat, de lapin, de souris et aussi chez l'homme.

#### 4°) Action des gonadotropines sur le tissu testiculaire.

Nous allons faire maintenant une rapide revue générale des différents travaux traitant plus particulièrement de l'action des gonadotropines sur les différentes étapes biosynthétiques.



SAMUELS et al. (132) ont déjà rapporté en 1951 la présence d'une  $3\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase testiculaire. Incubant des testicules cryptorchides de rats stimulés antérieurement par HCG en présence de prégnénolone, ils isolent de la progestérone et l'identifient par spectrographie infrarouge. La déhydroépiandrostérone est convertie en androstènedione par le même système dont le NAD est le co-facteur spécifique. Ces mêmes auteurs reprenant ces travaux en 1956 (131), montrent qu'après stimulation par la gonadotropine chorionique in vivo de rats hypophysectomisés, l'activité enzymatique augmente de façon importante. Cependant, la gonadotropine n'a pas d'effet in vitro. Il semble d'après ces auteurs que la stimulation s'exerce dans le sens d'une synthèse accrue de  $3\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase. En 1957, BRINCK-JOHNSSEN et EIK-NES (10) étudient l'action de HCG administrée par voie intraveineuse sur la sécrétion de testostérone et d'androstènedione du chien anesthésié. Ils montrent qu'en moins de trente minutes après administration de gonadotropine, les taux de ces deux stéroïdes augmentent considérablement dans la veine spermatique et ceci pendant plusieurs heures mais sans modification du rapport testostérone/androstènedione. Il semble que l'action de HCG ne s'exerce pas sur l'étape de réduction. Suivant un protocole similaire, MASON et SAMUELS (109) perfusent l'artère spermatique du chien avec de l'acétate- $^{14}\text{C}$ . Ils observent après





injection de HCG une augmentation significative de l'activité spécifique de la testostérone de même qu'une augmentation de sa sécrétion. La radioactivité du pool intermédiaire par contre reste très faible. D'après ces auteurs, l'action de HCG doit s'effectuer sur l'une des étapes précédant l'étape limitante, c'est-à-dire probablement avant la formation de prégnénolone.

Au cours de ces dernières années, nos connaissances dans ce domaine ont encore progressé grâce aux travaux de l'équipe d'EIK-NES, par utilisation d'hormones hypophysaires plus purifiées. Il a d'abord été démontré que l'administration d'ACTH chez le chien n'avait aucun effet sur la production de testostérone et aussi que l'effet du stress ne pouvait être incriminé dans son augmentation au cours des épreuves de stimulation. Par contre, l'injection d'ICSH ou de FSH provoque une augmentation du taux de cette hormone, constatation qui corrobore le travail précédent (42). L'action stimulatrice de FSH est discutable; il est probable qu'elle est due à une contamination par un faible pourcentage de ICSH. La stimulation préalable par HCG in vivo provoque une augmentation supplémentaire de la production des stéroïdes lorsque ICSH est ajoutée in vitro. Se basant sur les travaux antérieurs de HAYNES et BERTHET (69) et de PERON et KORITZ (118) sur le mécanisme d'action de l'ACTH, HALL et EIK-NES (67) comparent l'action de la gonadotropine et de l'AMP cyclique. Ils montrent que si l'addition



de FSH et surtout d'ICSH augmente la transformation d'acétate- $^{14}\text{C}$  en testostérone, l'addition d'AMP cyclique n'a aucune influence sur cette transformation. Cependant, lorsque l'on incube des homogénats de testicule en présence de cholestérol- $4\text{-}^{14}\text{C}$ , on obtient une transformation en testostérone, transformation qui est augmentée par addition de NADPH. L'addition de ICSH, de FSH ou d'AMP cyclique ne semble avoir aucune influence sur cette transformation.

#### 5°) Conclusions.

Que peut-on conclure à l'heure actuelle de tous ces travaux ? Il semble encore difficile de se faire une idée exacte du métabolisme testiculaire physiologique pour un certain nombre de raisons.

1 - Les différentes étapes du métabolisme n'ont pas toujours été étudiées chez le même animal et l'on sait que des variations peuvent exister même chez les mammifères.

2 - Les conditions employées ont été très diverses : tissus entiers ou dilacérés, homogénats, coupes de tissu, systèmes particuliers (mitochondries ou microsomes, surnageant), perfusions.



3 - L'influence des co-facteurs est encore très mal connue et beaucoup d'auteurs en ont abusé.

4 - L'action des gonadotropines demande encore une longue étude en particulier avec des produits très purifiés. Néanmoins, en procédant par analogie avec les métabolismes ovarien et corticosurrénal, on peut à l'heure actuelle brosser le tableau suivant :

Première étape.

L'acétyl-Coenzyme A étant considéré comme le précurseur initial, est converti en cholestérol et de fait SALOKANGAS et al. (129) ont pu montrer la transformation d'isopentényl pyrophosphate- $^{14}\text{C}$  en squalène et pour une faible part en lanostérol et en cholestérol; d'autre part, GAYLOR et SU-CHEN TSAI (59) ont pu montrer que des préparations de tissu testiculaire transforment le mévalonate-2- $^{14}\text{C}$  en lanostérol, et le lanostérol en cholestérol. Enfin, comme nous l'avons indiqué précédemment, le cholestérol semble être un intermédiaire obligatoire dans la biosynthèse des stéroïdes du testicule car le blocage au stade du desmostérol inhibe la formation de testostérone comme l'ont montré MENON et al. (114).

Deuxième étape (fig. 1a)

Le cholestérol est transformé en prégnénolone par une série de réactions bien établies pour la corticosurrénale, mais



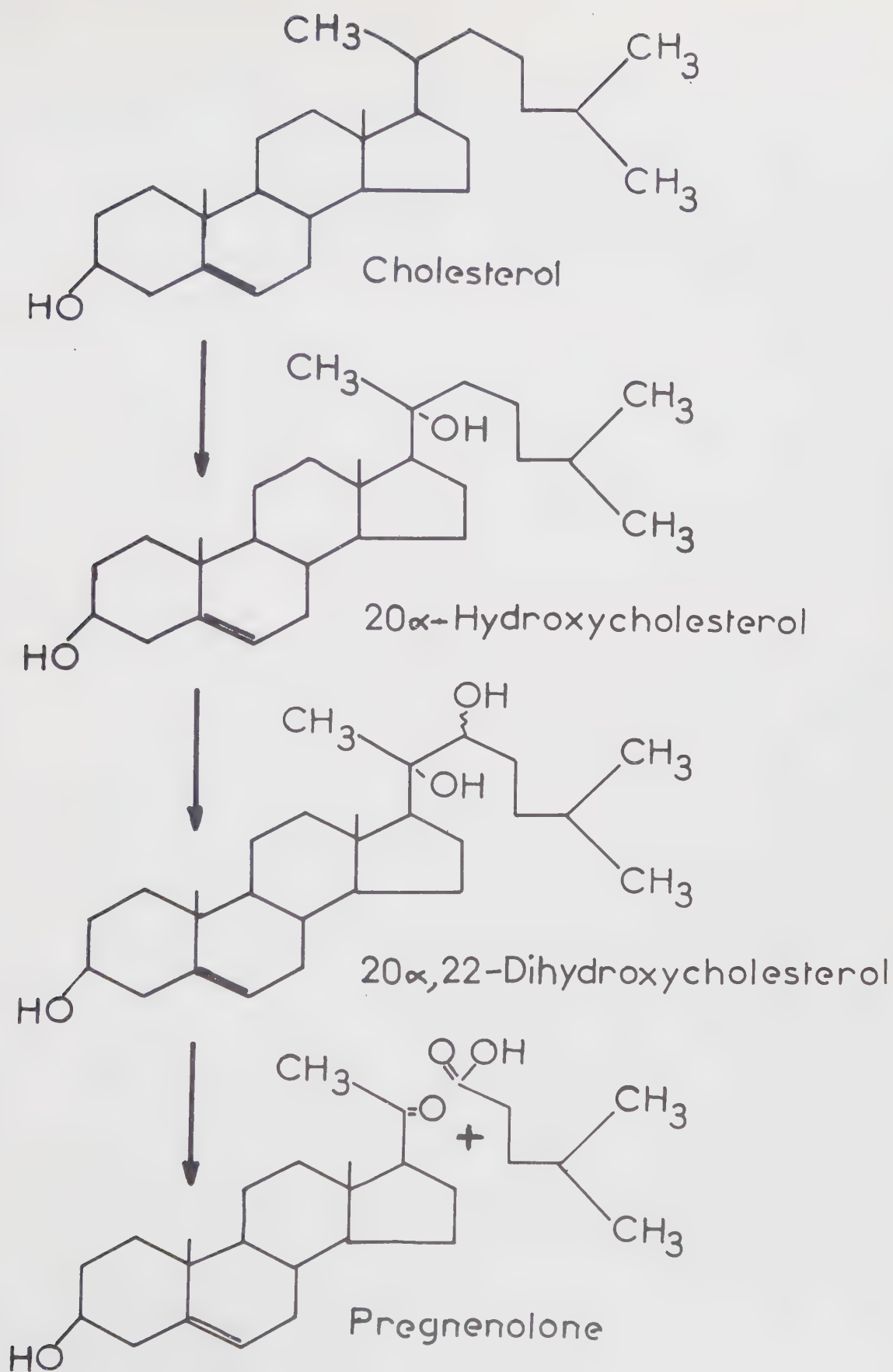


Fig. 1a

Biogénèse de la testostérone





incomplètement démontrées pour le testicule. Dans une première phase, le cholestérol donne naissance au 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol qui serait transformé en 20 $\alpha$ ,22-dihydroxycholestérol; ce dernier est clivé en prégnénolone et en acide isocaproïque.

#### Troisième étape (fig. 1b)

La prégnénolone est transformée en progestérone sous l'influence de la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase et de la stéroïde- $\Delta$ -isomérase isolée par TALALAY (155). L'irréversibilité de cette réaction considérée jusqu'à présent comme absolue est actuellement discutée (45, 124).

#### Quatrième étape (fig. 1b)

La progestérone est convertie en androstènedione et en testostérone. Cette transformation s'effectue dans les microsomes en présence de NADPH selon la séquence suivante : formation de 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone sous l'influence d'une 17 $\alpha$ -hydroxylase avec peut-être un composé intermédiaire : la 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogestérone. L'hydroxylation en 17 rend l'attaque possible par l'enzyme de clivage pour donner l'androstènedione et pour certains auteurs, de l'acide acétique. Une voie parallèle est probable, rejoignant la voie principale en plusieurs points : la prégnénolone est convertie en 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone, elle-même transformée en 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone sous l'action de la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase. La 17 $\alpha$ -



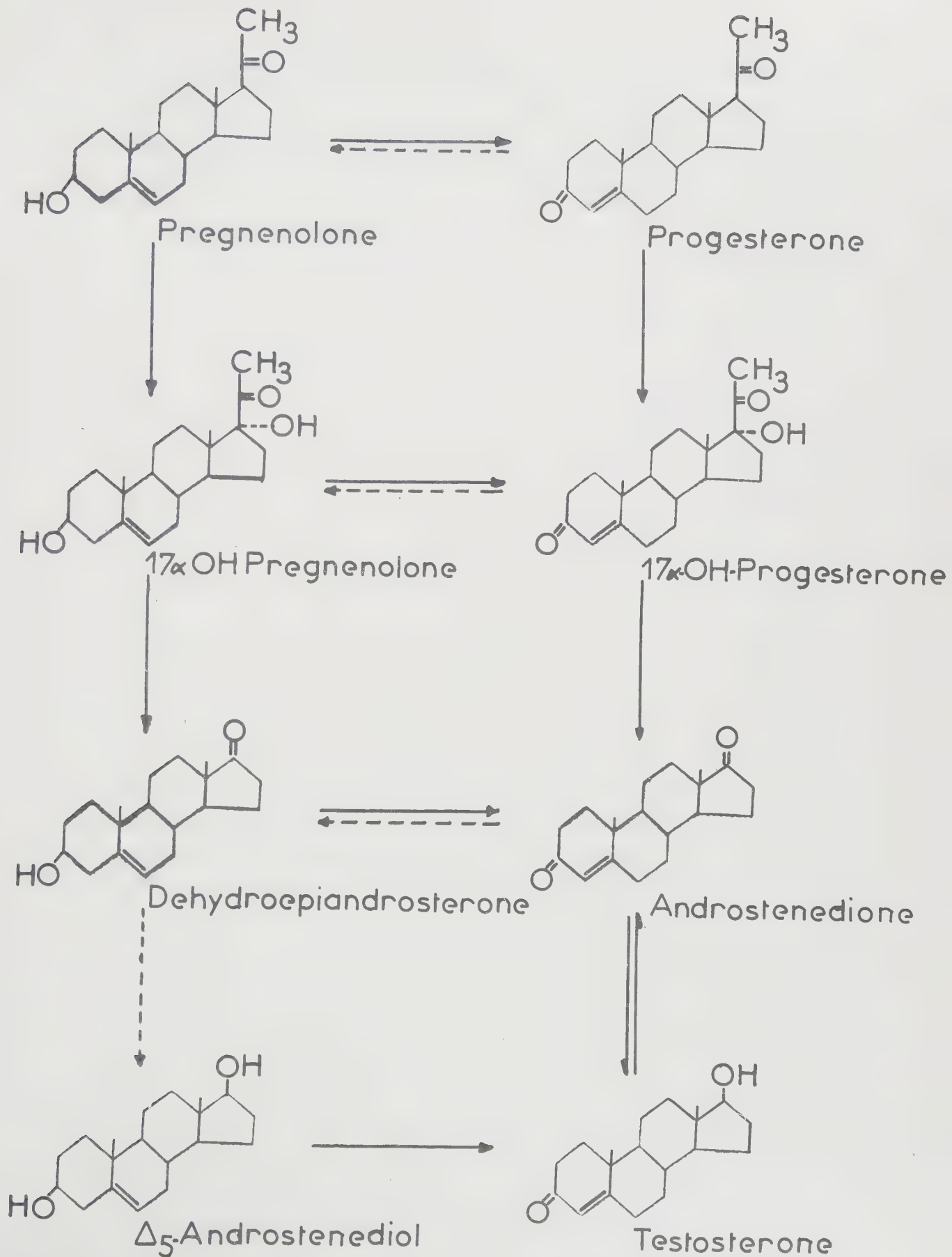


Fig. 1b

Biosynthèse de la testostérone (suite)



hydroxyprégnénolone est transformée en déhydroépiandrostérone qui est ensuite convertie en androstènedione. La déhydroépiandrostérone peut elle-même être transformée en androsta-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et rejoindre la voie principale au niveau de la testostérone (126). L'isolement récent du sulfate de testostérone dans le testicule laisse à penser qu'il existe aussi au niveau de ces tissus une voie des sulfates parallèle, semblable à celle qui a été démontrée au niveau de la corticosurrénale (32). Quant à l'importance relative de ces différentes voies métaboliques, elle est encore difficile à établir. S'il semble que chez le chien, la voie principale passe par la prégnénolone, la 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone, puis par la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone (44), il n'est pas du tout sûr qu'il en soit de même chez les autres mammifères et chez l'homme. Il semble cependant que la production de déhydroépiandrostérone soit très faible et que la voie métabolique passant par ce stéroïde soit mineure. D'autre part, la voie des sulfates si importante au niveau des corticosurrénales est très probablement négligeable au niveau du tissu testiculaire.





## B) CONTRIBUTION PERSONNELLE

### 1°) Etude du système enzymatique de clivage de la chaîne latérale du cholestérol au niveau des mitochondries de testicules de rat.

#### a) Introduction

Le clivage de la chaîne latérale du cholestérol est l'une des principales réactions de la biosynthèse des stéroïdes hormonaux et il est à peu près certain que les tissus endocriniens ont en commun le même système enzymatique permettant la transformation du cholestérol en prégénolone. La séquence des réactions a été particulièrement bien établie pour la corticosurrénale et, dans cet organe, le cholestérol subit une série d'hydroxylations, d'abord en position  $20\alpha$ , puis en position 22, bien que l'ordre de ces hydroxylations ne soit pas encore absolument certain. Quoiqu'il en soit, on aboutit à un intermédiaire dihydroxylé qui par l'action d'un système enzymatique de clivage donne naissance, d'une part à la prégénolone et d'autre part à l'aldéhyde isocaproïque qui est rapidement oxydé en acide isocaproïque. Cependant, s'il est bien établi que l'ACTH au niveau de la corticosurrénale et l'ICSH au niveau des gonades ont comme point d'impact principal le clivage de la chaîne



latérale du cholestérol, on n'avait pas pu encore préciser la localisation exacte de leurs effets, c'est-à-dire l'étape limitante de cette séquence enzymatique.

Grâce aux synthèses de 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol froid d'une part et marqué par le  $^{14}\text{C}$  en position 22 d'autre part, réalisées par le Docteur GUT, aux travaux de TOREN et al. (156) sur la localisation mitochondriale de ce système enzymatique et à ceux d'ICHII et al. (79) sur l'action stimulatrice des gonadotropines ajoutées in vitro à une préparation acellulaire de corps jaune, nous avons pu réaliser nos recherches.

#### b) Matériel et procédure expérimentale

Le cholestérol-26- $^{14}\text{C}$  (A.S. = 14  $\mu\text{C}/\mu\text{mole}$ ) nous a été fourni par la firme New England Nuclear Corporation; il a été purifié par chromatographie sur papier dans les systèmes heptane-phényl-cellosolve et heptane-méthanol-eau (50:40:10, v/v). La firme Calbiochem Co. nous a fourni le NADPH. La gonadotropine chorionique (HCG-APL) a été fournie par AYERST Company. L'hormone ICSH (LH, NIH-LHB<sub>2</sub>) nous a été très aimablement offerte par l'Endocrine Study Section de l'U.S. Public Health Service.

#### - Préparation des mitochondries testiculaires.

Des rats mâles Sprague-Dawley sont sacrifiés par décapitation, les testicules sont prélevés, décapsulés et placés dans du



saccharose tamponné 0,25 M et refroidis dans de la glace (saccharose 0,25 M - tampon phosphate 0,066 M, pH 7,2; 3:1, v/v). Les manipulations ultérieures sont effectuées dans une chambre froide à 4°C. Le tissu est alors pesé, homogénéisé avec 5 fois son poids de la même solution et l'homogénat centrifugé à 700 x g pendant 15 min. à 0°C. Le surnageant est prélevé et centrifugé à 6.500 x g. pendant 25 min. afin de sédimenter les mitochondries. Ce sédiment est remis en suspension dans la même solution et centrifugé pendant 15 min. à 20.000 x g. Cette procédure est répétée trois fois et les mitochondries lavées sont enfin mises en suspension dans une solution de saccharose tamponné de telle façon que 0,8 ml de cette suspension correspondent à 1 g. de tissu frais.

#### - Incubation

Les incubations ont été réalisées dans un incubateur DUBNOFF en général à 37°C pendant deux heures dans les conditions suivantes : dans un bécher de 20 ml, on ajoute successivement du cholestérol-26-<sup>14</sup>C (280.000 d.p.m., soit 0,03 µg) dissous dans 0,1 ml de propylène-glycol, 2,0 µmoles de cyanure de sodium dont l'addition ainsi que l'a montré TOREN multiplie par 2 ou par 3 le taux de clivage, 2,7 µmoles de NADPH, 0,8 ml de la suspension mitochondriale et enfin un certain nombre d'autres composants ainsi qu'il sera indiqué plus loin dans le texte.



- Extraction et dosage de l'acide isocaproïque

La technique que nous avons suivie a été décrite par ICHII (79). On arrête l'incubation par addition de 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3N. Le mélange est distillé sous vapeur d'eau pendant 10 min.; le distillat, 10 ml environ, est recueilli, amené à pH 1-2 par addition de quelques gouttes de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3N et extrait deux fois par 15 ml d'éther. Afin de se débarrasser du cholestérol contaminant, les fractions étherées combinées sont alors extraites par trois fois 5 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,1N, l'extrait alcalin est acidifié avec 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3N et extrait par 20 ml d'éther. La fraction étherée contenant l'acide isocaproïque est transférée dans des flacons à scintillation, rendue alcaline par addition de KOH éthanolique 0,25 M et concentrée à sec sous azote. On ajoute alors au résidu sec 10 ml de solution scintillante (4 g. de 2,5-10-phényloxazole et 100 mg de 1,4-bis-2(5-phényloxazole) benzène dissous dans 1 litre de toluène) (MATHESON, COLEMAN et BELL, East Rutherford, N.J.). Après addition de 3 gouttes d'acide acétique glacial pour remettre l'acide isocaproïque en solution, la radioactivité est déterminée au moyen d'un compteur à scintillation PACKARD TRICARB Modèle 314 E X.





### c) Résultats

#### 1. Caractéristiques du système enzymatique (40)

Il faut d'abord mentionner le fait qu'un certain nombre de variations ont été observées d'une expérience à l'autre, en utilisant différents groupes de rat, même lorsque nous avons appliqué les mêmes conditions expérimentales. De façon à obtenir des résultats comparables et compte tenu des variations saisonnières de l'activité enzymatique du tissu testiculaire de rat, nous avons dans chaque expérience effectué un contrôle de référence dans des conditions standardisées. La fig. 2 montre l'influence de la composition du milieu d'incubation sur le degré de clivage de la chaîne latérale du cholestérol. Si on réalise une incubation dans du KCl 0,154 M tamponné par un tampon phosphate 0,066 M (pH 7,4), 0,40 % du substrat est converti en acide isocaproïque. Quand on remplace le KCl par du saccharose 0,25 M, le rendement en acide isocaproïque augmente jusqu'à 1,7 % et quand on remplace le tampon phosphate par un tampon Tris-HCl, le rendement est encore augmenté jusqu'à atteindre 2,1 %. De plus, l'utilisation du saccharose permet d'obtenir une meilleure fidélité des résultats, étant donné que ce milieu ne provoque pas d'agglomération des particules comme cela est le cas lorsque KCl est employé. Lorsqu'on utilise le milieu saccharose-Tris-HCl, la suspension reste toujours absolument homogène.



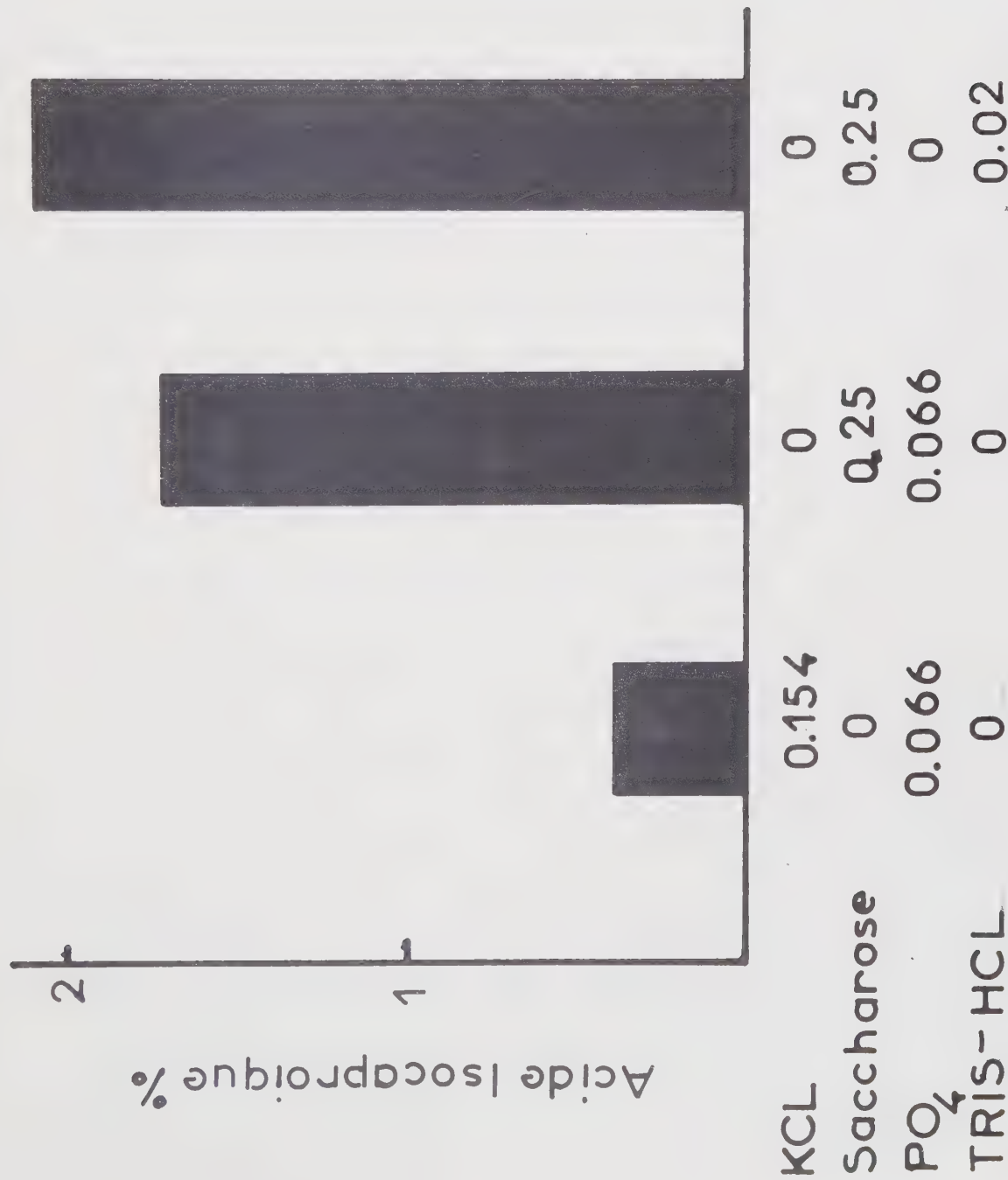


Fig. 2 Influence de la composition du milieu d'incubation sur le clivage de la chaîne latérale du cholestérol.



Le pH exerce aussi une action très importante sur le clivage de la chaîne latérale du cholestérol (fig. 3). Par addition d'un tampon Tris-maléate 0,02 M, l'activité augmente progressivement jusqu'à un pH optimum voisin de 7,4. Lorsque l'on remplace le tampon Tris-maléate par un tampon Tris-HCl au même pH, on observe une augmentation significative du taux de clivage qui est multiplié par 2 ou par 3 et qui diminue rapidement lorsque l'on augmente le pH jusqu'à 8,6. Il est intéressant de noter que le milieu et la molarité les plus satisfaisants pour ces expériences sont les mêmes que ceux utilisés par LYNN et BROWN (105) dans leurs travaux sur les propriétés enzymatiques des microsomes des testicules de cobaye; cependant, ce pH diffère du pH optimum déterminé par KORITZ (95) pour l'étude des mêmes réactions au niveau de la surrénale de rat (pH 6,2).

L'utilisation d'un tampon Tris-HCl 0,02 M à pH 7,4 nous a permis de faire une étude plus approfondie des exigences en cations de ce système enzymatique (fig. 4). Lorsque l'incubation est réalisée dans du saccharose tamponné par un tampon phosphate 0,066 M en présence de 40  $\mu$ moles de  $MgCl_2$ , le rendement en acide isocaproïque est de 0,3 %. Quand on remplace le tampon phosphate par le tampon Tris-HCl même sans addition de cations, on obtient un rendement identique en acide isocaproïque. L'addition de 40  $\mu$ moles de  $MgCl_2$  multiplie par 8 le taux de clivage de la



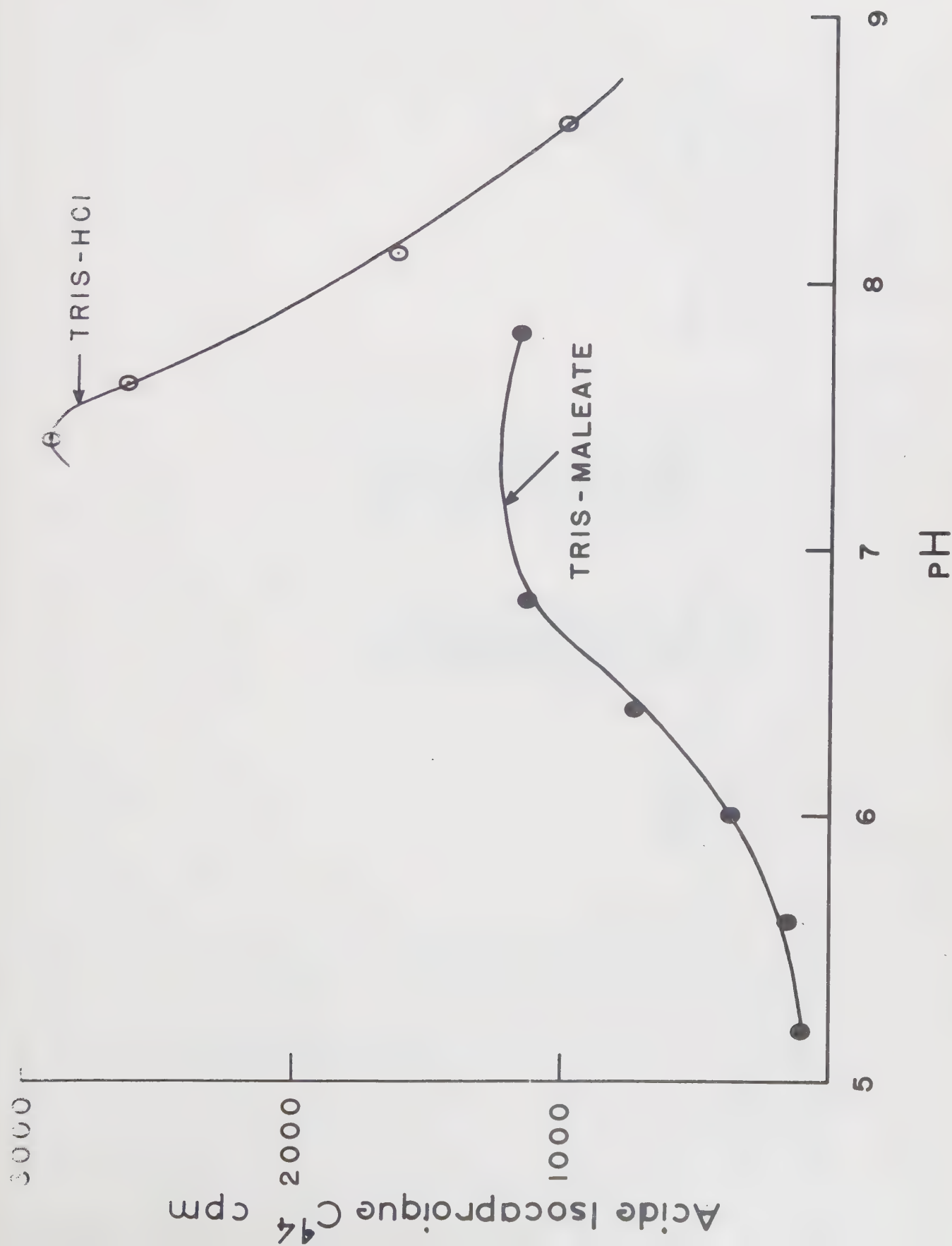


Fig. 3 Influence du pH et de la composition du tampon sur le taux de clivage de la chaîne latérale du cholestérol.





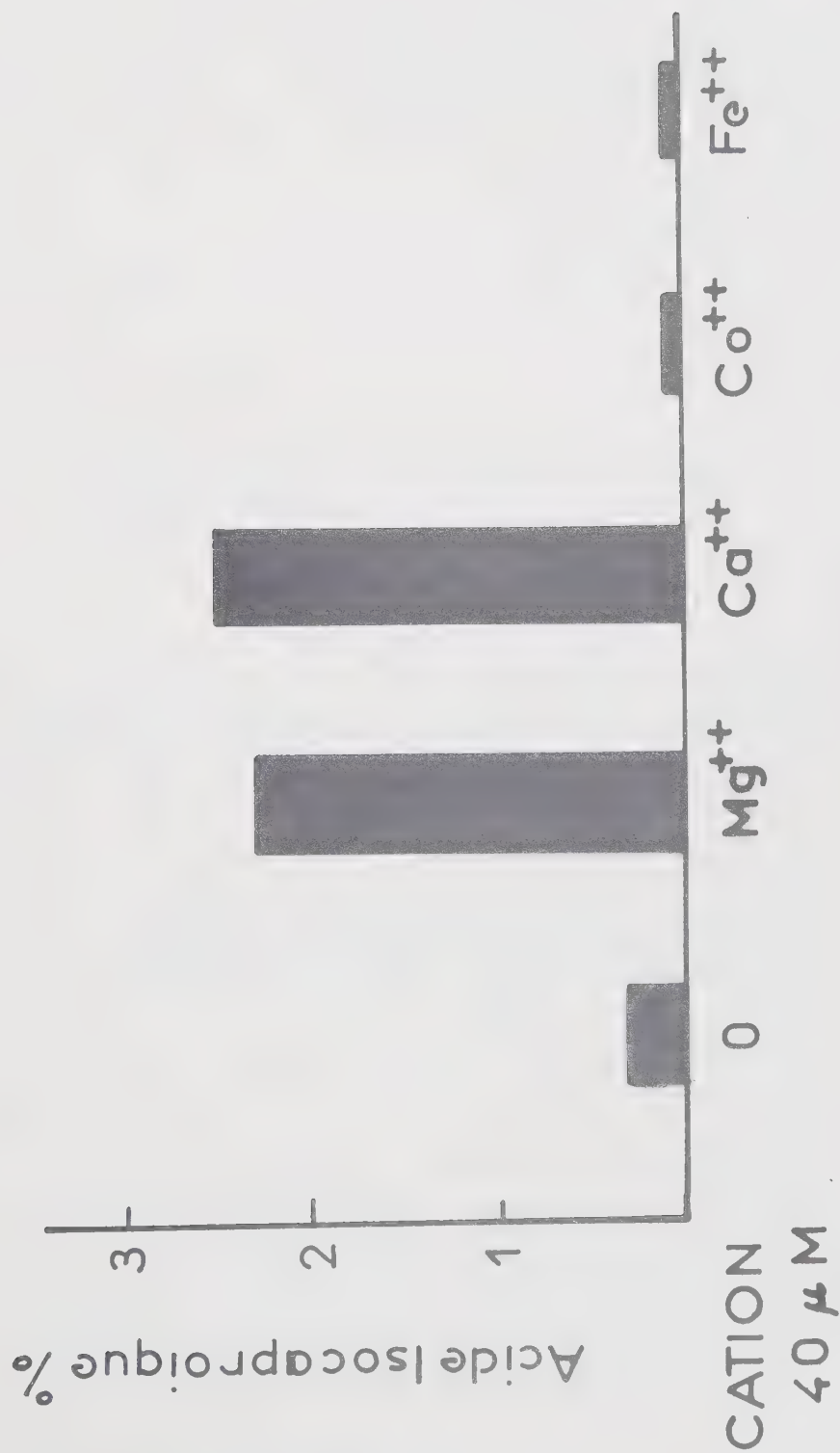


Fig. 4 Influence des cations bivalents sur le taux de clivage de la chaîne latérale du cholestérol.



chaîne latérale du cholestérol (2,3 %). Lorsque l'on remplace  $\text{MgCl}_2$  par la même quantité de  $\text{CaCl}_2$ , on augmente encore le rendement (2,5 %). Par contre, à la même concentration,  $\text{CO}^{++}$  et  $\text{Fe}^{++}$  sont inhibiteurs. Le  $\text{Ca}^{++}$  s'étant révélé être plus actif que  $\text{Mg}^{++}$ , nous avons entrepris la détermination de la concentration optimale en calcium (fig. 5). Le taux de clivage augmente de 0,10 % en présence de 4  $\mu\text{moles}$  de calcium, jusqu'à un maximum de 2,3 % en présence de 10  $\mu\text{moles}$  de calcium et diminue progressivement lorsque l'on augmente encore la concentration.

Par ailleurs, nous avons montré que l'addition de  $\text{KCl}$  augmente encore le taux de clivage (fig. 6). En présence de 10  $\mu\text{moles}$  de  $\text{CaCl}_2$ , la conversion augmente progressivement de 4,3 % ( 0  $\mu\text{moles}$  de  $\text{KCl}$  ) jusqu'à 5,6 % (120  $\mu\text{moles}$  de  $\text{KCl}$ ) et diminue lorsque l'on augmente encore la concentration en  $\text{KCl}$ . Cependant, en l'absence de  $\text{CaCl}_2$ , même à des très hautes concentrations en  $\text{KCl}$ , le rendement en acide isocaproïque tombe au 1/10 de sa valeur précédente. Cette constatation est en opposition avec les observations de PERON et KORITZ (118) sur les préparations de corticosurrénales de rat. Ces auteurs ont observé que lorsque l'on augmente la concentration en  $\text{KCl}$ , le calcium perd son pouvoir d'activateur. D'autre part,  $\text{Fe}^{++}$  exerce une action stimulatrice au niveau de la corticosurrénale à l'encontre de ce qui se produit au niveau du testicule.



%

Acide Isocaproïque

2

1

CaCl<sub>2</sub> μM

4

8

10

20

40

80

160

Fig. 5

Influence de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  sur le clivage  
de la chaîne latérale du cholestérol.



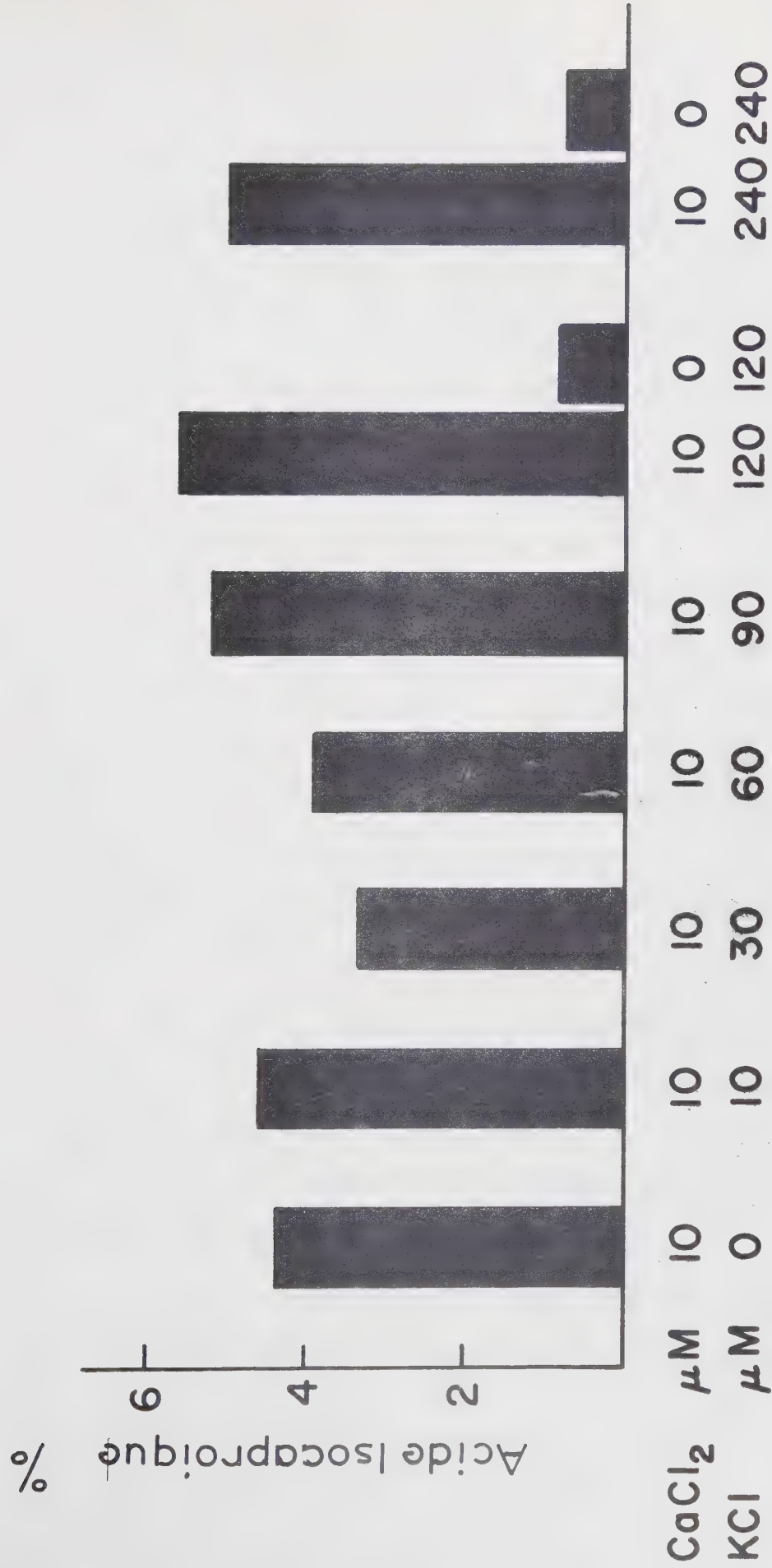


Fig. 6 Influence de KCL en présence ou en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  sur le taux de clivage de la chaîne latérale du cholestérol.





Il semble donc exister des différences notables entre le comportement des préparations mitochondriales de la corticosurrénale et du testicule quant à l'action des cations, suggérant que les deux systèmes enzymatiques sont de nature différente, même si leurs fonctions sont identiques. TOREN et al. (156) ont montré que NADPH ou un système générateur de NADPH est le co-facteur préférentiel pour la réaction de clivage de la chaîne latérale du cholestérol. NADH est 5 fois moins actif et  $\text{NAD}^+$  10 fois moins actif que NADPH. Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées, nous avons pu déterminer la concentration optimale en NADPH qui est de 2,7  $\mu\text{moles}$  par incubat (fig. 7). HALKERSTON (65) avait déjà déterminé que NADPH est le co-facteur préférentiel des préparations de mitochondries de corticosurrénale de boeuf. Cependant, dans le cas des homogénats de corps jaune de boeuf, ICHII et al. (79) ont montré que  $\text{NADP}^+$  et  $\text{NAD}^+$  sont plus actifs que NADPH.

Nous avons aussi étudié le taux de clivage en fonction du temps (fig. 8). Le degré de clivage augmente très rapidement pendant les 30 premières minutes pour ralentir pendant les 60 minutes suivantes puis la courbe tend à devenir parallèle à l'axe des abscisses.

KORITZ et PERON (96) ont démontré que la préincubation de corticosurrénale de rat augmente la production de prégnénolone



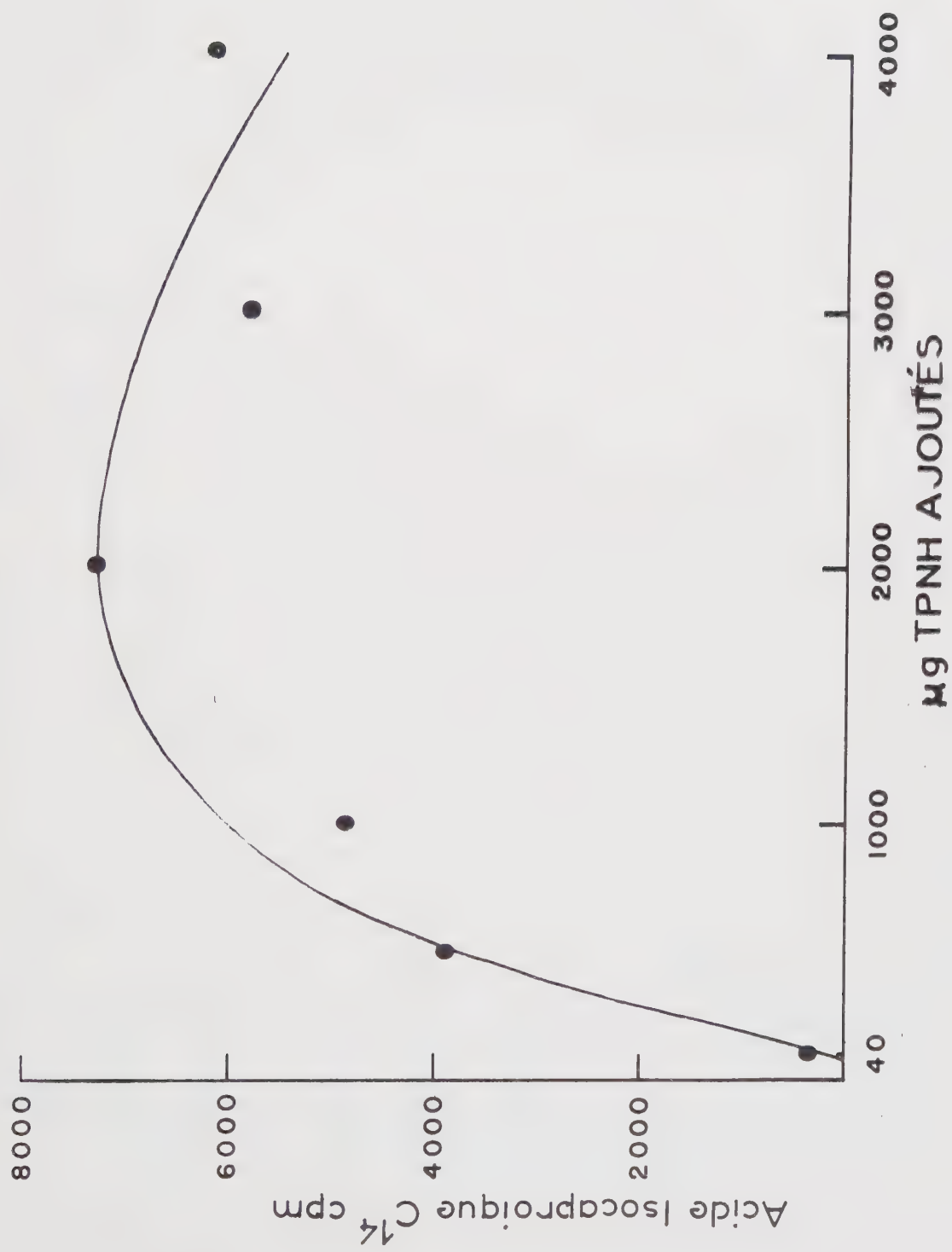


Fig. 7 Effet de la concentration en NADPH sur le taux de clivage de la chaîne latérale du cholestérol.



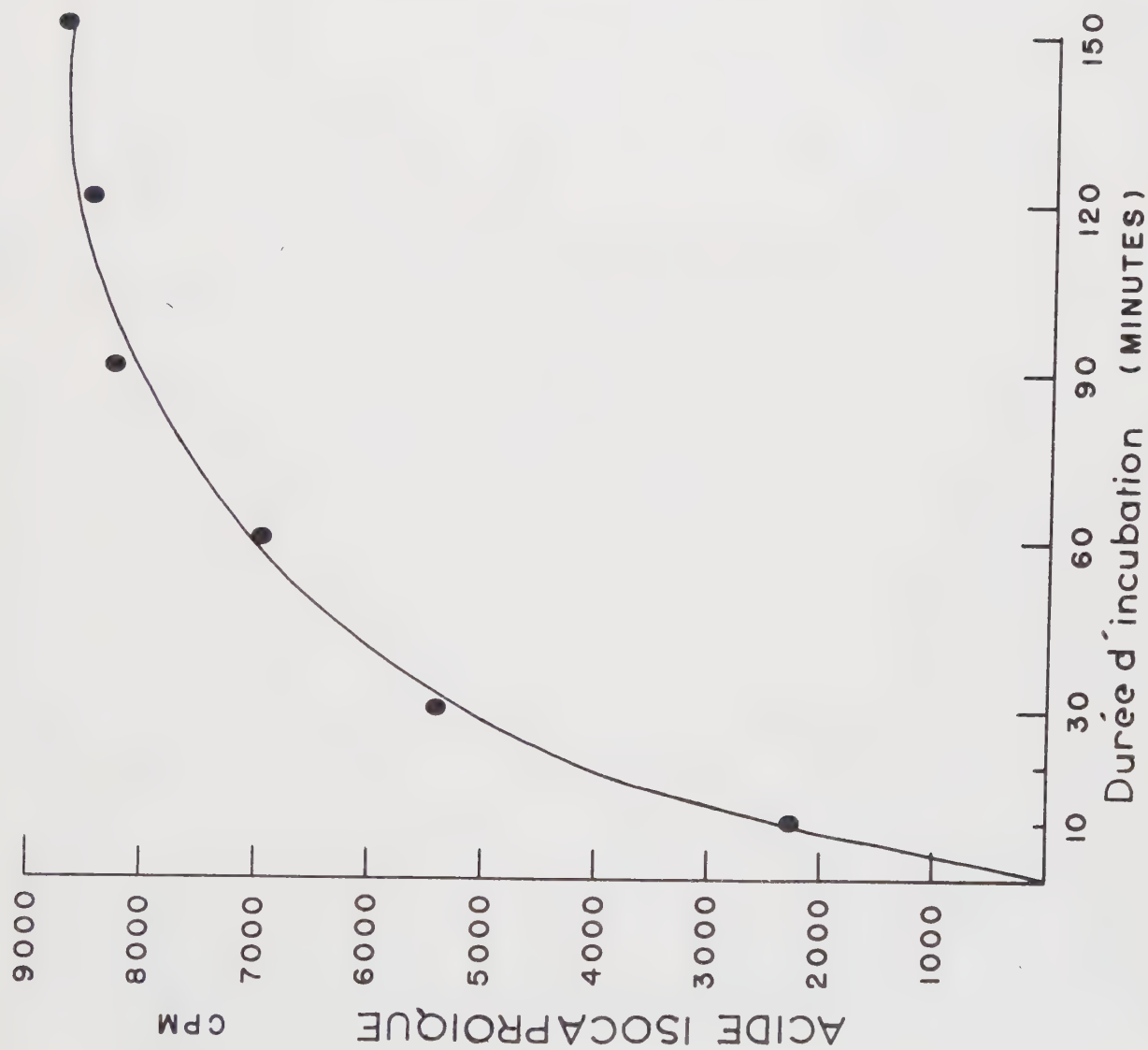


Fig. 8 Influence de la durée d'incubation sur le taux de clivage de la chaîne latérale du cholestérol



Nous n'avons pas pu reproduire ces mêmes résultats en préincubant des préparations de mitochondries de testicule de rat et au contraire la préincubation a produit un effet contraire, inhibiteur (Tableau I). Alors que dans les dosages de contrôle 2.000 c.p.m. d'acide isocaproïque- $^{14}\text{C}$  sont libérés, lorsque la préparation est préincubée pendant une heure soit avec addition de substrat soit après addition de NADPH (2 ou 1 mg), le taux de conversion obtenu est absolument négligeable (300 à 400 c.p.m.).

Il semble que dans toutes ces conditions de préincubation où la combinaison substrat - co-facteur est incomplète, la réaction enzymatique est altérée suggérant que cette combinaison protège le complexe enzymatique et empêche, soit sa destruction, soit son utilisation par le cholestérol endogène permettant ainsi son utilisation pour le clivage du cholestérol-26- $^{14}\text{C}$  exogène. HALL et EIK-NES (67) ont rapporté des résultats négatifs identiques avec des tranches de testicule de lapin préincubées pendant une heure avec ou sans addition de glucose. Par ailleurs, KORITZ et PERON (96) ont montré que des homogénats de tissu corticosurrénal gelé produisent une quantité accrue de corticostéroïdes, alors que l'exposition de préparations de mitochondries de testicule de rat à des températures basses, même pour une période de temps limitée produit une diminution rapide de l'activité enzymatique.





TABLEAU .I.

| DUREE<br>PREINCUBATION<br>(heures) | DUREE<br>INCUBATION<br>(heures) | NADPH<br>AJOUTE A<br>PREINCUBATION<br>mg | NADPH<br>AJOUTE A<br>INCUBATION<br>mg | SUBSTRAT<br>AJOUTE A<br>PREINCUBATION<br>cpm | SUBSTRAT<br>AJOUTE A<br>INCUBATION<br>cpm | ACIDE<br>ISOCAPROIQUE<br>LIBERE<br>cpm |
|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|
| 0                                  | 2                               |                                          | 2                                     |                                              | 130.000                                   | 2.100                                  |
| 0                                  | 2                               |                                          | 2                                     |                                              | 130.000                                   | 1.900                                  |
| 1                                  | 2                               | 0                                        | 2                                     | 130.000                                      |                                           | 310                                    |
| 1                                  | 2                               | 2                                        | 0                                     |                                              | 130.000                                   | 280                                    |
| 1                                  | 2                               | 1                                        | 1                                     |                                              | 130.000                                   | 410                                    |
| 1                                  | 2                               | 0                                        | 2                                     |                                              | 130.000                                   | 240                                    |

INFLUENCE DE LA PREINCUBATION SUR LE TAUX DE CLIVAGE DE LA CHAÎNE LATÉRALE DU CHOLESTÉROL.

(chaque bécher contient en plus de la préparation mitochondriale, 2,0  $\mu$ moles NaCN, 120  $\mu$ moles KCl, 10  $\mu$ moles  $\text{CaCl}_2$ . Le mélange est complété à 2,0 ml avec du saccharose 0,25 M tamponné par du tampon Tris-HCl 0,02 M, pH 7,4. Les incubations ont été réalisées à 37° C dans l'air).



Enfin, un certain nombre de tentatives ont été faites pour essayer de solubiliser le complexe enzymatique en utilisant différentes méthodes comme la préparation de poudre acétonique, l'addition de lécithine d'oeuf ou de boeuf à la poudre acétonique selon la technique de GREEN (62), la dialyse contre du n-butanol et enfin par l'action des ultra-sons.

Toutes les tentatives que nous avons faites pour essayer de rompre la structure mitochondriale, soit par refroidissement, soit par usage de l'acétone, soit par dialyse ont été suivies d'une perte complète de l'activité. Ces échecs mettent en relief l'extrême fragilité du complexe enzymatique opérant le clivage de la chaîne latérale du cholestérol des mitochondries du testicule de rat que l'on peut opposer à la stabilité remarquable du complexe enzymatique correspondant de la corticosurrénale et du corps jaune de vache.

Dans une série d'expériences que nous avons réalisées avec K.M.J. MENON (113), nous avons pu démontrer deux autres séries de faits se rapportant à ce même problème : d'une part, le fait que la mesure de l'acide isocaproïque est une détermination suffisamment fidèle du taux de clivage de la chaîne latérale du cholestérol, et d'autre part, que certains métabolites exercent un effet d'inhibition sur cette séquence enzymatique.



Après incubation de la préparation mitochondriale avec du cholestérol-4-<sup>14</sup>C, les métabolites radioactifs ont été isolés et les rendements sont présentés dans le Tableau II. La production de prégnénolone (0,35 %) s'est révélée très faible comparée à celle des autres produits (progestérone 1,31 %, 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone 1,31 % et testostérone 0,48 %) ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec le tissu corticosurrénal. Le taux de clivage du cholestérol a été mesuré en réalisant des incubations parallèles avec la même préparation enzymatique mais en utilisant du cholestérol-26-<sup>14</sup>C comme substrat. Cependant, ainsi que le montrent les Tableaux II et III, nous avons observé une différence entre le rendement en acide isocaproïque (5,2 %) et le rendement total des stéroïdes (3,45 %). Cette divergence est sans doute à mettre sur le compte de pertes incontrôlables au cours de la purification des stéroïdes.

Au cours des incubations avec le cholestérol-26-<sup>14</sup>C, nous avons pu isoler un composé qui se comporte comme le 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol en chromatographie sur papier (Tableau III). La zone radioactive a été éluée et purifiée par chromatographie dans plusieurs systèmes, puis diluée avec plusieurs mg de 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol et cristallisée jusqu'à activité spécifique constante. Cet isolement du 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol au niveau du testicule de rat succède à l'isolement du même métabolite au niveau d'autres tissus comme la corticosurrénale et le corps jaune.



TABLEAU .II.

| STEROIDES                        | %    |
|----------------------------------|------|
| Prégnénolone                     | 0,35 |
| Progestérone                     | 1,31 |
| 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone | 1,31 |
| Testostérone                     | 0,48 |
| Total .....                      | 3,45 |

BIOSYNTHESE DE LA TESTOSTERONE ET D'AUTRES  
STEROIDES PAR UNE PREPARATION DE MITOCHONDRIES  
DE TESTICULES DE RATS, APRES INCUBATION DE  
CHOLESTEROL-4-<sup>14</sup>C (1,1 x 10<sup>6</sup> c.p.m.).

TABLEAU .III.

| PRODUITS ISOLES             | %    |
|-----------------------------|------|
| Acide isocaproïque          | 5,2  |
| 20 $\alpha$ -OH cholestérol | 0,28 |

ISOLEMENT DU 20 $\alpha$ -HYDROXYCHOLESTEROL, APRES  
INCUBATION DE CHOLESTEROL-26-<sup>14</sup>C (8 x 10<sup>5</sup> c.p.m.).





Certains métabolites du cholestérol exercent un effet d'inhibition sur le système enzymatique de la chaîne latérale de clivage du cholestérol. En effet, quand on ajoute du 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol froid à une incubation de mitochondries testiculaires en présence de cholestérol, le clivage de la chaîne latérale est fortement inhibé. 5  $\mu$ g de 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol produisent une inhibition de 30 % et 40  $\mu$ g produisent une inhibition de 90 % (Tableau IV). La testostérone exerce aussi un effet inhibiteur extrêmement puissant non seulement sur la production d'acide isocaproïque (Tableau V) mais aussi sur celle du 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol (Tableau VI). Cette rétroinhibition joue certainement un rôle important dans la régulation de la production de testostérone par le testicule.

## 2. Action des gonadotropines chorionique (HCG) et hypophysaires (FSH et ICSH) (113)

Lorsqu'on administre de l'hormone gonadotrope choriale à des rats immatures et que l'on mesure la production d'acide isocaproïque in vitro, on observe une augmentation importante du taux de clivage qui est multiplié par 3 avec une dose de 70 unités de HCG et qui croît encore lorsqu'on augmente la dose d'hormone gonadotrope chorionique (fig. 9). Lorsque cette hormone est administrée à des rats matures à la dose de 200 unités



| 20 $\alpha$ -C AJOUTE $\mu$ g | ACIDE ISOCAPROIQUE- <sup>14</sup> C (c.p.m.) | INHIBITION % |
|-------------------------------|----------------------------------------------|--------------|
| 0                             | 5530                                         | ----         |
| 5                             | 3800                                         | 31,6         |
| 10                            | 2230                                         | 59,7         |
| 20                            | 1460                                         | 73,7         |
| 40                            | 550                                          | 90,1         |
| 100                           | 300                                          | 94,6         |

INHIBITION IN VITRO DU CLIVAGE DE LA CHAÎNE LATÉRALE DU CHOLESTÉROL-26-<sup>14</sup>C  
PAR ADDITION DE 20 $\alpha$ -HYDROXYCHOLESTÉROL (20 $\alpha$ -C).

TABLEAU .V.

| TESTOSTERONE AJOUTÉE $\mu$ g | ACIDE ISOCAPROIQUE- <sup>14</sup> C (c.p.m.) | INHIBITION % |
|------------------------------|----------------------------------------------|--------------|
| 0                            | 8570                                         | ----         |
| 20                           | 3220                                         | 63,4         |
| 40                           | 1700                                         | 79,4         |

INHIBITION IN VITRO DU CLIVAGE DE LA CHAÎNE LATÉRALE DU CHOLESTÉROL-26-<sup>14</sup>C  
PAR ADDITION DE TESTOSTERONE.

TABLEAU .VI.

| TESTOSTERONE AJOUTÉE $\mu$ g | ACIDE ISOCAPROIQUE- <sup>14</sup> C (c.p.m.) | INHIBITION % |
|------------------------------|----------------------------------------------|--------------|
| 0                            | 7300                                         | ----         |
| 20                           | 3044                                         | 57,6         |
| 40                           | 2170                                         | 69,4         |

INHIBITION IN VITRO DU CLIVAGE DU 22-<sup>14</sup>C-20 $\alpha$ -HYDROXYCHOLESTÉROL  
PAR ADDITION DE TESTOSTERONE.



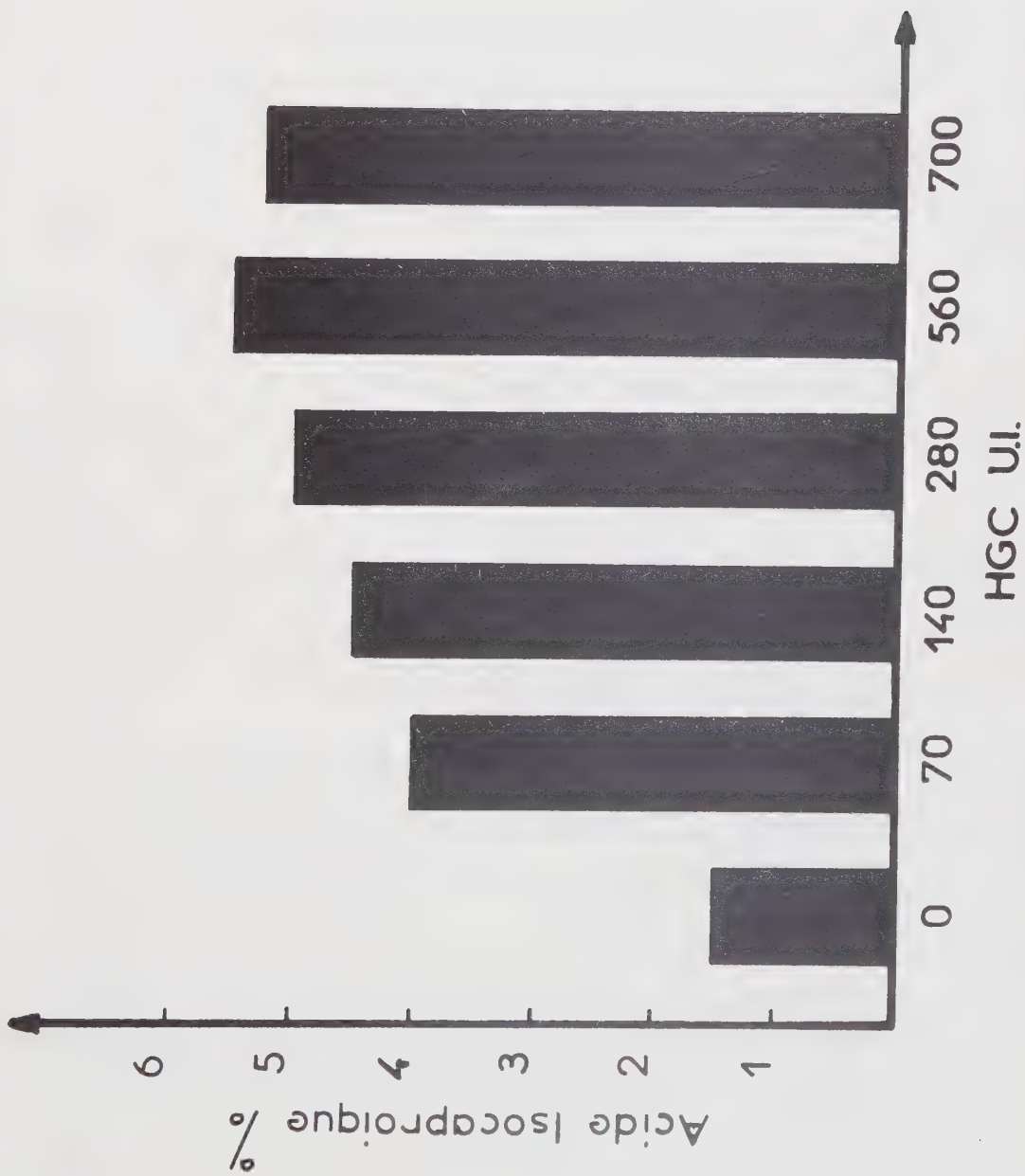


Fig. 9 Production d'acide isocaproïque après administration de HCG *in vivo* à des rats immatures.



par jour pendant 7 jours, la formation d'acide isocaproïque est encore plus importante et peut s'élever de 5 à 6 fois au-dessus de sa valeur initiale (de 2,1 % à 12,6 % dans une expérience). Cependant, l'administration de ICSH ou FSH à des rats immatures, in vivo, ne provoque aucune augmentation de la production d'acide isocaproïque. Mais lorsque ICSH et FSH sont associées dans le rapport 80/20 et que ce mélange est administré à la dose de 100 µg par jour pendant 7 jours, on observe une augmentation de 33 % du taux de clivage de la chaîne latérale du cholestérol. Il semble donc que FSH et ICSH agissent de manière synergique (fig. 10). A l'opposé, chez le rat hypophysectomisé on observe une réponse au traitement par ICSH et FSH. En effet, lorsque l'on administre 60 µg de ICSH pendant 4 jours à des rats mâles hypophysectomisés de 21 jours, on observe une augmentation considérable de la production d'acide isocaproïque dont le taux devient 10 fois supérieur à celui des animaux témoins (fig. 11).

L'hypophysectomie réduit considérablement le taux de clivage du cholestérol. En effet, 3 jours après hypophysectomie, le taux de clivage tombe à 1/7 de celui des animaux matures intacts et 7 jours après hypophysectomie, ce taux diminue encore (fig. 12). Mais si l'on traite ces animaux avec ICSH, le taux d'acide isocaproïque remonte jusqu'à un taux 9 fois supérieur à celui des animaux hypophysectomisés non traités (fig. 13).





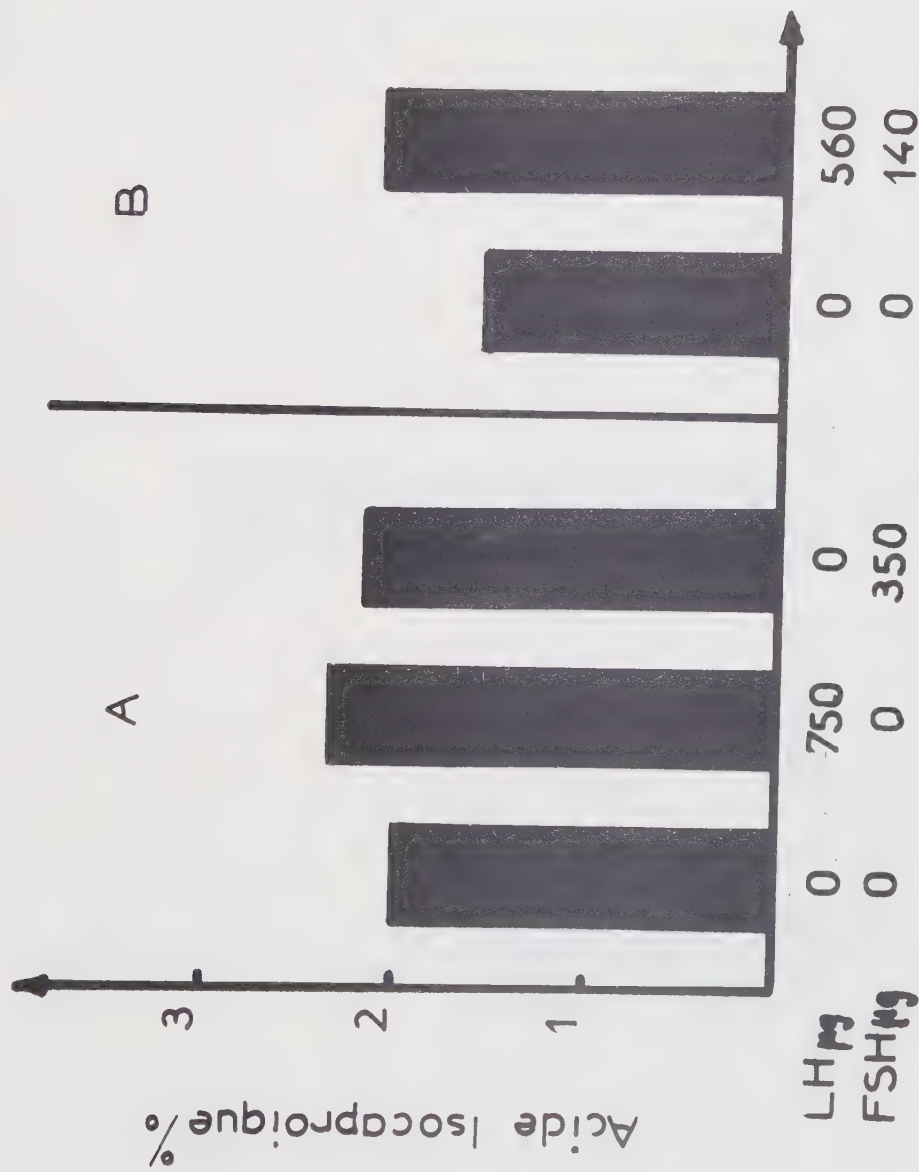


Fig. 10 - A Résultats de l'administration in vivo de LH et FSH pendant 7 jours à des rats immatures.

- B Résultats de l'administration in vivo d'un mélange de LH et FSH pendant 7 jours à des rats immatures.



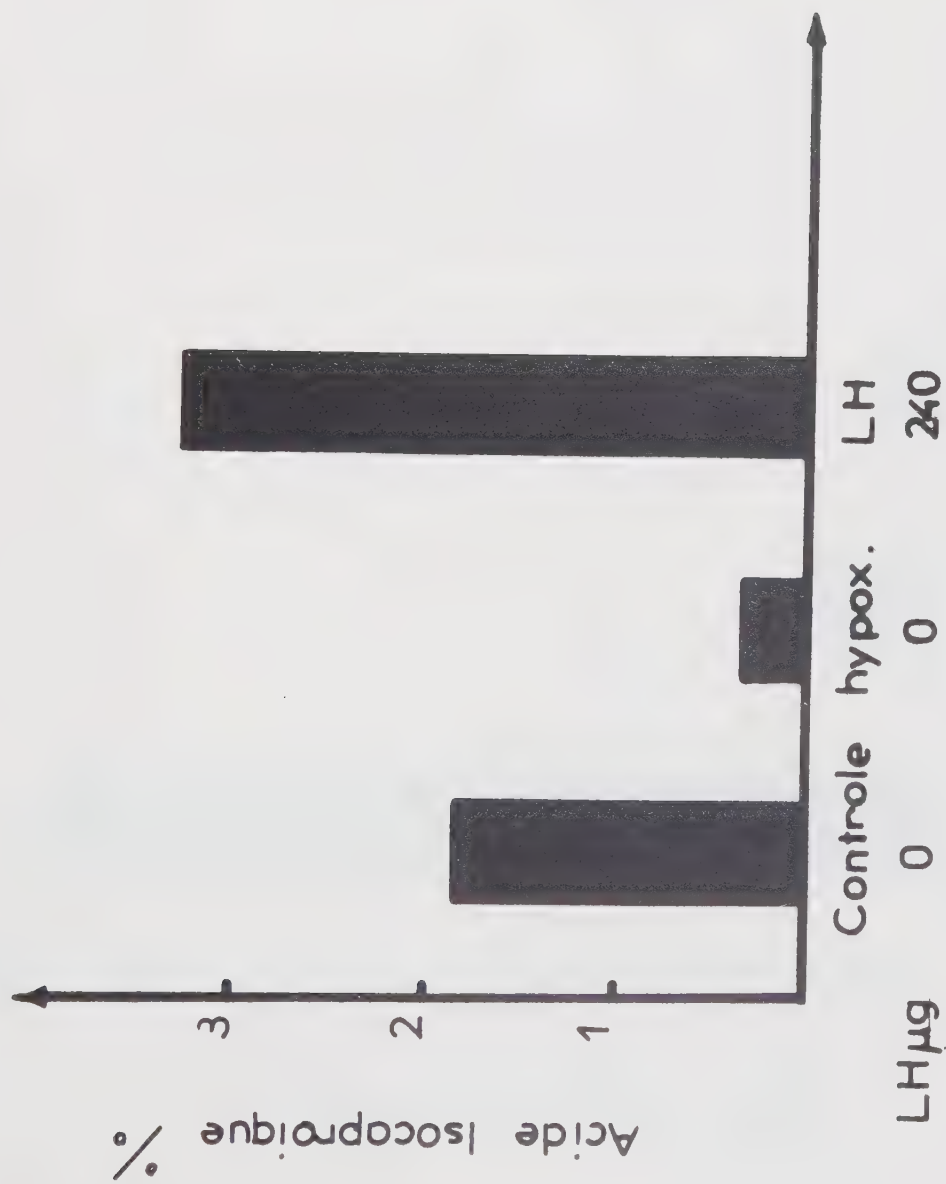


Fig. 11

Résultats de l'administration de LH pendant 4 jours à des rats immatures hypophysectomisés.



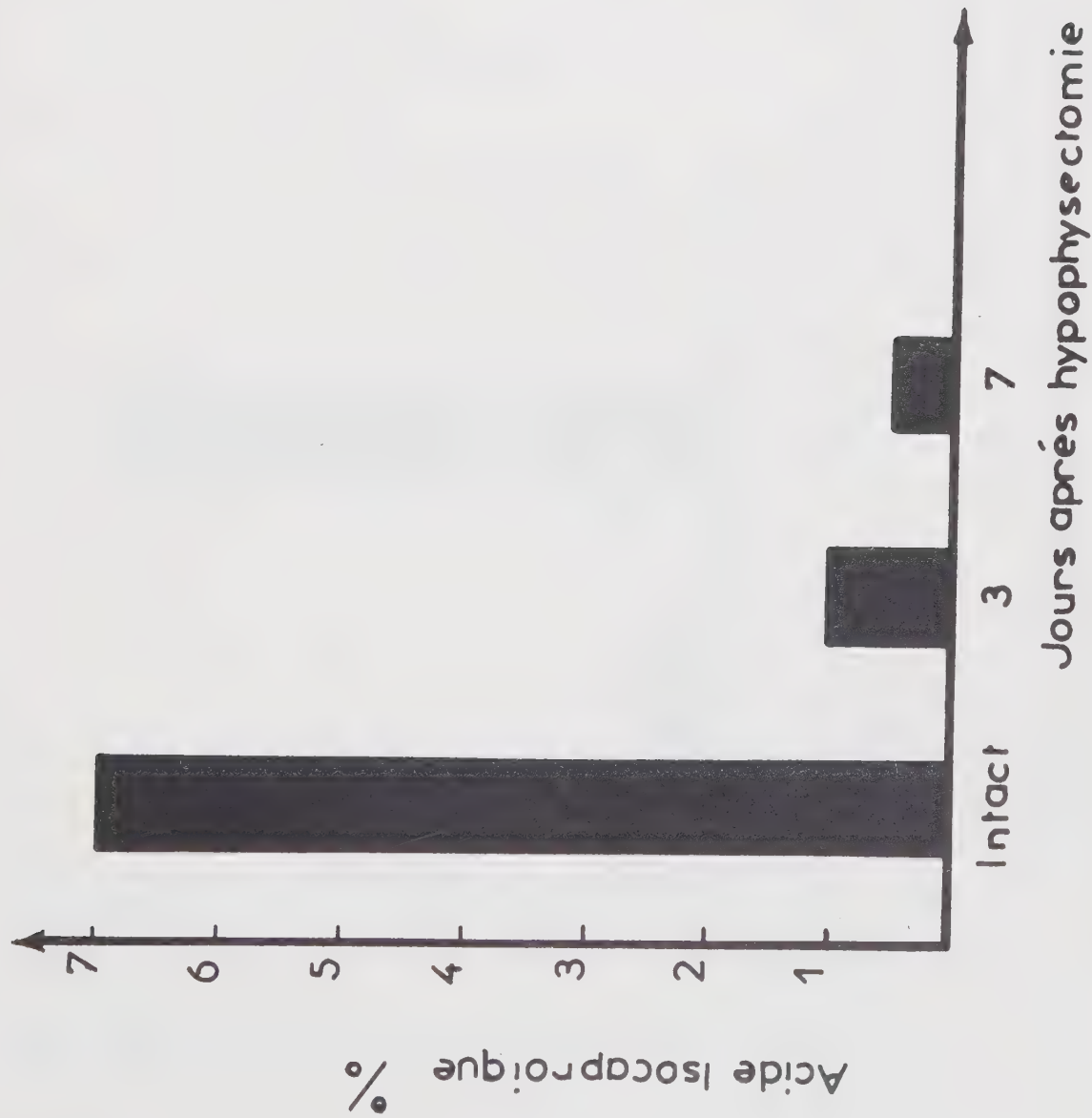


Fig. 12

Influence de l'hypophysectomie chez le rat mature sur la libération d'acide isocaproïque



FSH stimule aussi la production d'acide isocaproïque chez l'animal hypophysectomisé, mais son effet est beaucoup moins important (fig. 14).

Il est aussi intéressant de comparer la production d'acide isocaproïque à partir du cholestérol-26- $^{14}\text{C}$  et du 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol-22- $^{14}\text{C}$  chez les animaux matures et immatures. Le taux de clivage du cholestérol chez l'animal mature est 3 fois supérieur à celui des préparations testiculaires de rats immatures. Cependant, le taux de clivage du 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol est approximativement le même à partir de préparations de testicules de rats matures ou immatures. Le point le plus intéressant de cette expérience est le fait que le taux de production d'acide isocaproïque à partir du 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol est approximativement 200 fois supérieur à celui obtenu à partir du cholestérol (fig. 15). Ce phénomène permet de penser que la réaction limitante de la séquence enzymatique qui mène du cholestérol à la prégnénolone se situe probablement au niveau de la 20 $\alpha$ -hydroxylation du cholestérol et que cette hydroxylation est sous l'influence des gonadotropines. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons administré 100 unités de HCG pendant 7 jours à des rats mâles de 25 jours. La préparation mitochondriale a été incubée séparément avec du cholestérol-26- $^{14}\text{C}$  et du 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol-22- $^{14}\text{C}$  et le taux de clivage de ces deux substrats a été déterminé. La figure 16 montre à l'évidence





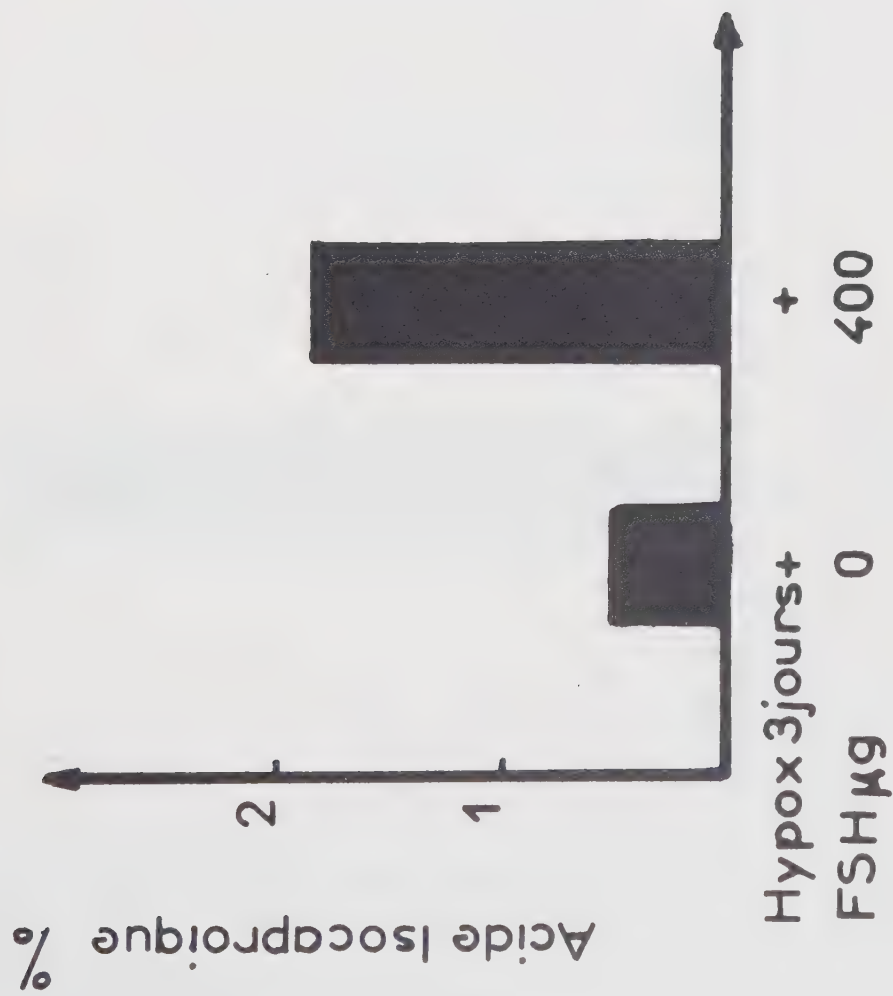


Fig. 14 Influence de l'administration de FSH pendant 4 jours à des rats matures hypophysectomisés sur la libération d'acide isocaproïque.



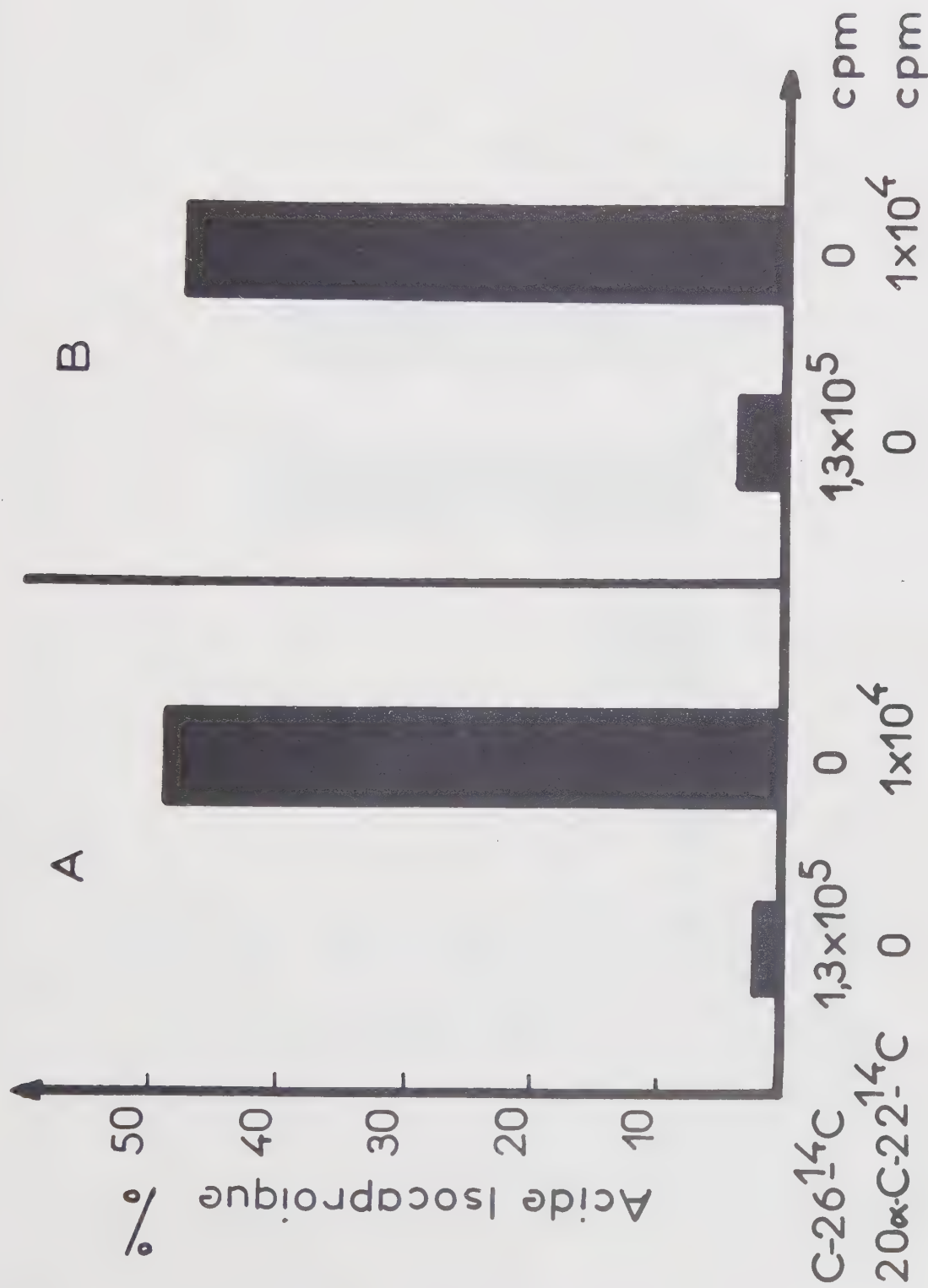


Fig. 15

Conversion du cholestérol-26-<sup>14</sup>C (C<sub>26</sub>-<sup>14</sup>C) et du 20α-hydroxycholestérol-22-<sup>14</sup>C (20α C-22-<sup>14</sup>C) en acide isocaproïque par une suspension mitochondriale de testicule de rat immature (A) et mature (B).



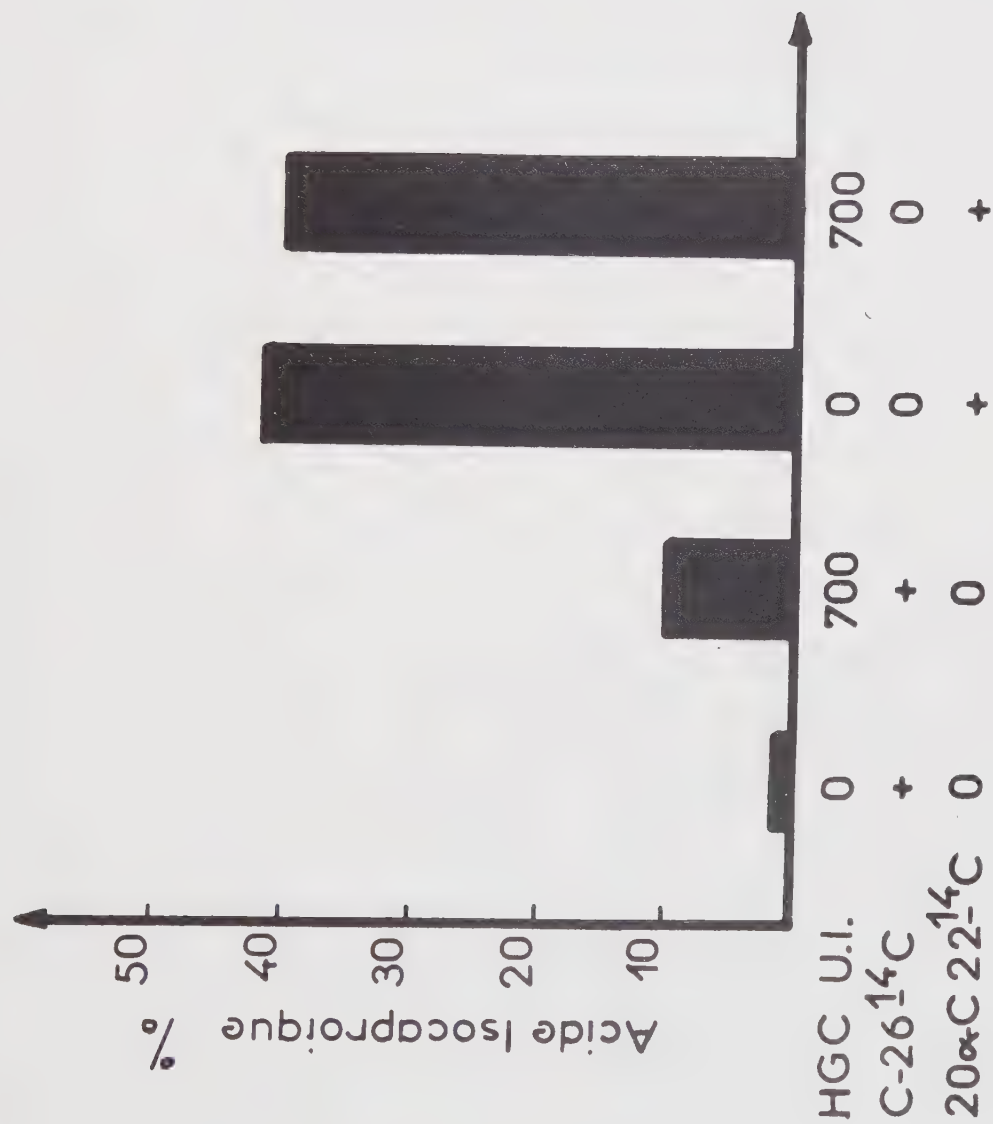


Fig. 16

Influence de l'administration de HCG pendant 7 jours  
sur le clivage de la chaîne latérale du cholestérol  
(C) et du 20α-hydroxycholestérol (20α-C).



que le traitement par la gonadotropine chorionique augmente de façon importante le taux de clivage du cholestérol alors qu'il n'a aucun effet sur celui du  $20\alpha$ -hydroxycholestérol, ce qui prouve que la  $20\alpha$ -hydroxylation est la réaction limitante de cette séquence enzymatique. Ces résultats sont en accord avec les travaux de STONE et HECHTER (149) sur la corticosurrénale de boeuf et d'ICHII et al. (79) sur le corps jaune de vache qui ont montré que, d'une part l'ACTH, d'autre part les gonadotropines hypophysaires, exerçaient leur action sur la transformation du cholestérol en prégnénolone et très probablement au niveau de la  $20\alpha$ -hydroxylation (fig. 17).

Cependant, alors qu'ICHII et al. (79) avaient pu montrer une production accrue d'acide isocaproïque après addition de gonadotropines in vitro à une préparation acellulaire de corps jaune de vache, l'addition de gonadotropine chorionique ou de ICSH à la préparation mitochondriale de testicule de rats immatures ou matures intacts ou préalablement traités par HCG ne provoque aucune augmentation du clivage de la chaîne latérale du cholestérol (Tableau VII). Ces résultats sont en accord avec ceux de MACCHI et HECHTER (106) et de SCHONBAUM (136) avec la corticosurrénale et ceux de HALL et EIK-NES (68) avec des testicules de lapin montrant que l'addition in vitro d'ACTH ou de gonadotropines à des tranches de tissu provoque une





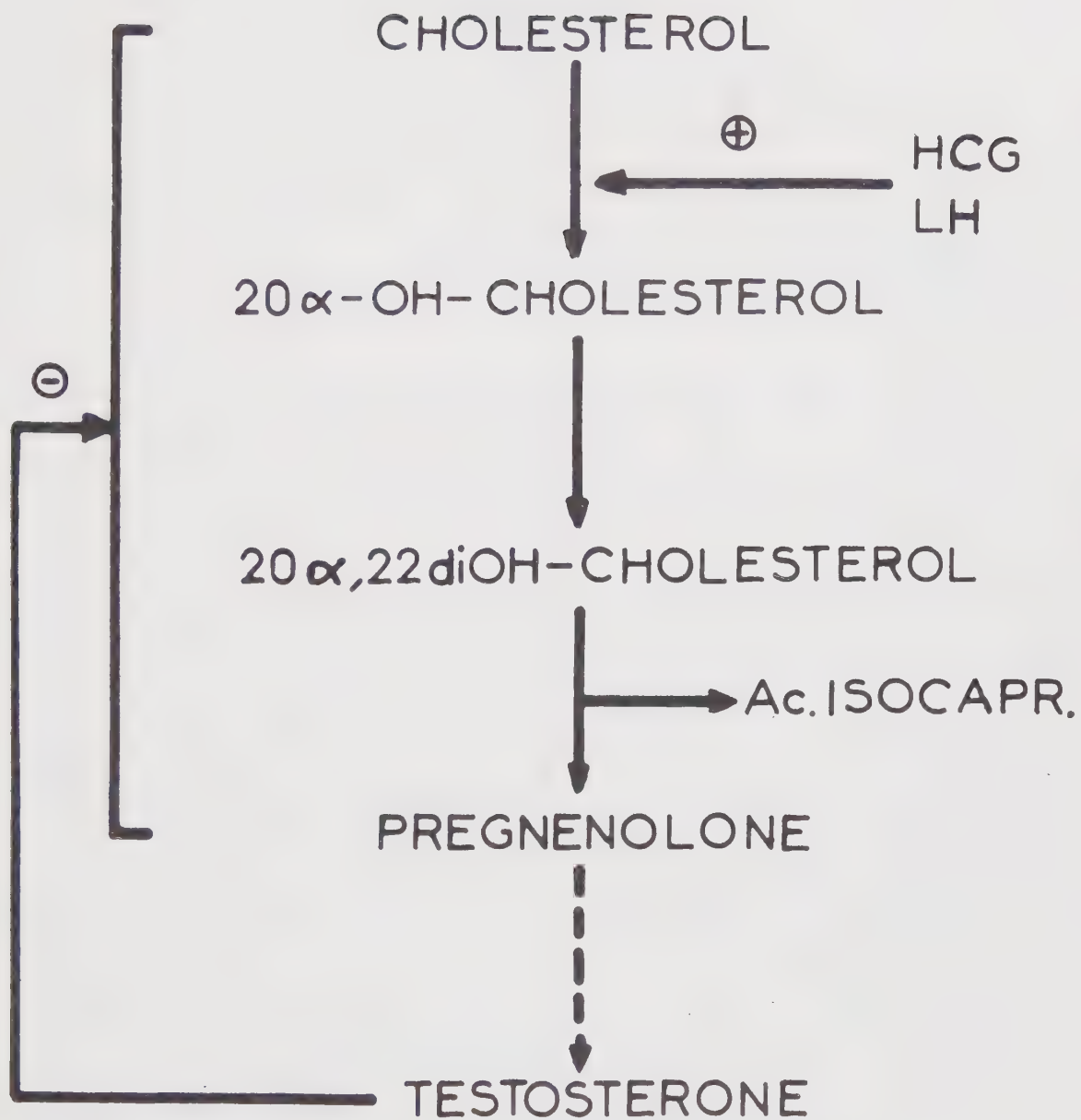


Fig. 17

Point d'impact de l'action des gonadotropines et effet de retro-inhibition de la testostérone.



TABLEAU .VII.

|                                       |     | RATS MATURES     | RATS IMMATURES |
|---------------------------------------|-----|------------------|----------------|
| TEMOIN                                |     | 2,1 <sup>o</sup> | 2,3            |
| HCG seule                             |     | 12,6             | 12,8           |
| HCG<br>in vivo<br>+<br>LH<br>in vitro | 10  | 12,1             | -              |
|                                       | 20  | 11,7             | 11,9           |
|                                       | 40  | -                | 12,3           |
|                                       | 80  | 13,3             | 12,2           |
|                                       | 100 | 13,6             | 12,45          |

<sup>o</sup> Moyenne de deux estimations

POURCENTAGE DE CLIVAGE DE LA CHAÎNE LATÉRALE DU CHOLESTÉROL  
AU NIVEAU DES MITOCHONDRIES DE TESTICULE DE RAT AVANT ET APRÈS  
TRAITEMENT PAR 40 U. DE HCG PENDANT 7 JOURS ASSOCIÉ OU NON À  
L'ADDITION IN VITRO DE DOSES CROISSANTES DE LH.



augmentation de la production de stéroïdes alors que l'addition d'hormones hypophysaires à des homogénats ne provoque aucune stimulation.

2<sup>e</sup>) Recherches sur une nouvelle voie de biosynthèse de la testostérone dans le tissu testiculaire de rat.

a) Introduction

Cette série d'expériences a eu comme point de départ les travaux : - d'une part de FONKEN et al. (51) qui incubant une préparation de Cladosporium resinae avec de la progestérone ont réussi à mettre en évidence dans le milieu d'incubation de l'acétate de testostérone - d'autre part de FORCHIELLI et al. (53) qui incubant des homogénats d'ovaire avec de la progestérone marquée par du tritium en  $17\alpha$  isolent en fin d'incubation de la testostérone toujours marquée par le tritium. Ce fait démontre que la  $17\alpha$ -hydroxylation de la progestérone n'a pas eu lieu et que l'acétate de testostérone est un intermédiaire possible entre la progestérone et la testostérone. Ainsi que le montre la figure 18, deux voies sont donc possibles : la première fait intervenir une hydroxylation en  $17\alpha$ , suivie d'une 17-20 desmolyse, la seconde débiterait par une peroxydation donnant naissance à l'acétate de testostérone qui serait ensuite



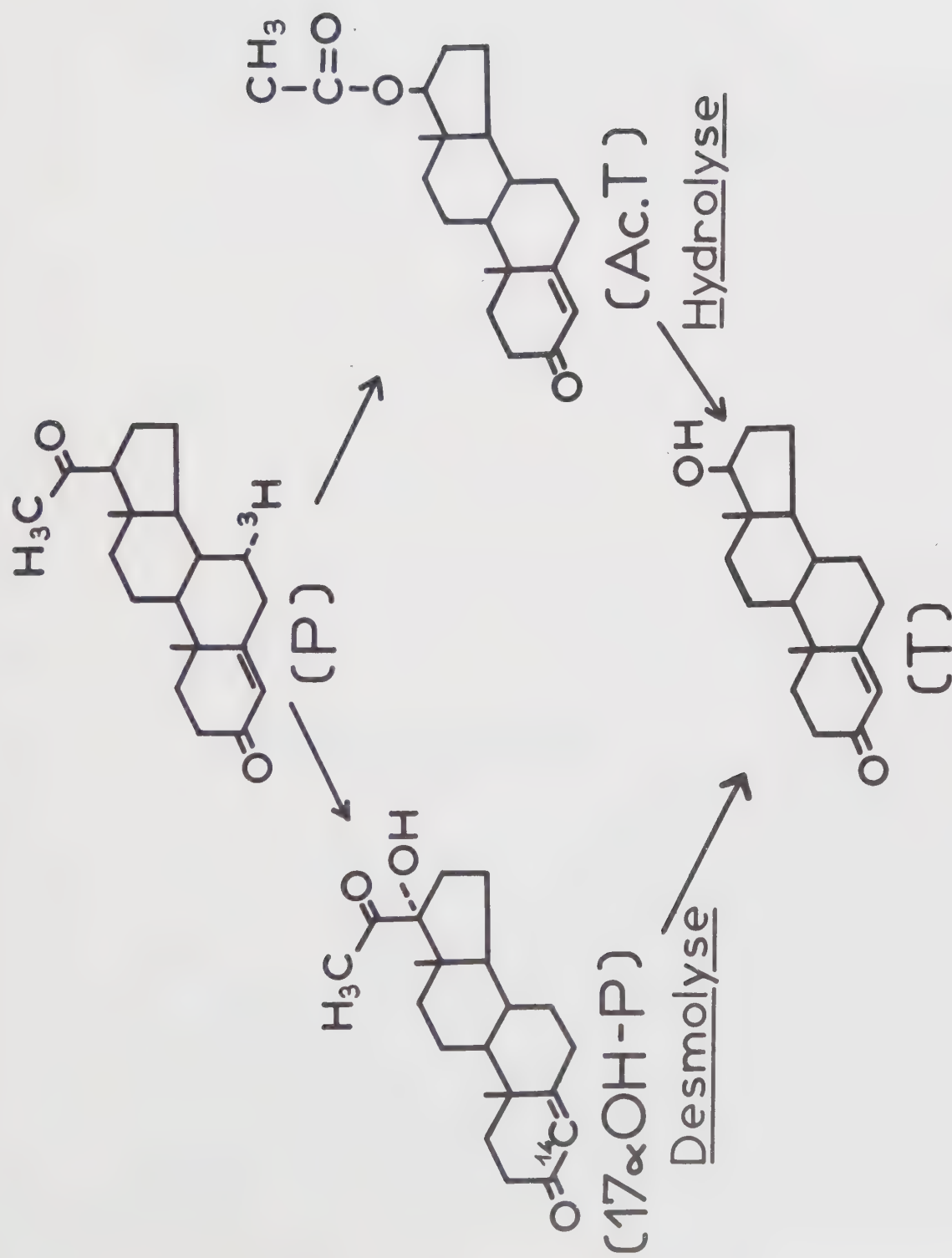


Fig. 18

Voies de biogénèse de la testostérone à partir de la progestérone.





clivé hydrolytiquement pour donner la testostérone. Si on utilise comme substrats de la progestérone marquée au  $^3\text{H}$  et de la  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone marquée au  $^{14}\text{C}$ , on doit obtenir dans le cas de la desmolyse, de la testostérone marquée par les deux isotopes alors que dans le cas de l'hydrolyse, la testostérone ne sera marquée que par le  $^{14}\text{C}$ .

C'est cette dernière éventualité que nous avons essayée de mettre en évidence avec la préparation mitochondriale de testicule de rat.

#### b) Matériel et méthode

La préparation du sédiment mitochondrial, la technique d'incubation, celle de l'extraction des métabolites et de leur identification ont été précédemment décrites.

#### - Source des substrats.

Ceux-ci ont été fournis par la firme New England Nuclear Corporation. Le cholestérol-4- $^{14}\text{C}$  est purifié par chromatographie sur papier, d'abord dans le système heptane/phényl-cellosolve, puis dans le système heptane/méthanol-eau (50:40:10) (B.A.). La progestérone-7- $^3\text{H}$  est purifiée par chromatographie sur papier dans le système ligroïne/propylène-glycol et dans le système B.A.. La  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone-4- $^{14}\text{C}$  est purifiée par chromatographie sur papier dans le système cyclohexane-benzène (1:1)/



propylène-glycol (CH.B./P.G.), puis dans le système heptane-benzène/méthanol-eau (33:17:40:10) (B3). La testostérone-4- $^{14}\text{C}$  est purifiée dans le système B3. L'androstènedione-4- $^{14}\text{C}$  est obtenue par oxydation chromique de la testostérone et purifiée dans les systèmes CH.B./P.G. et B.A.. La testostérone-1,2- $^3\text{H}$  et l'androstènedione-1,2- $^3\text{H}$  sont obtenues et purifiées comme il a été décrit plus haut pour les composés marqués par le  $^{14}\text{C}$ .

### - Identification des métabolites

Les métabolites radioactifs sont localisés à l'aide d'un appareil VANGUARD équipé d'un détecteur pour chromatoplaques. Pour toutes les chromatographies en couche mince (C.C.M.) nous avons utilisé du silicagel G (Brinckman Instrument, Inc., Great Neck, L.I., New-York). La localisation des stéroïdes froids possédant une fonction  $\Delta_4$ -3 cétonique, tant sur les chromatographies sur papier que sur les chromatoplaques a été réalisée avec une lampe à rayonnement ultraviolet (245 mμ).

### c) Résultats

#### 1. Incubation de la préparation mitochondriale avec du cholestérol-4- $^{14}\text{C}$ et de la progestérone-7α- $^3\text{H}$

L'incubation est réalisée en présence de  $2,04 \times 10^6$  d.p.m (20 μg) de cholestérol-4- $^{14}\text{C}$  (A.S. = 50 μC/mg) et de  $28 \times 10^6$



d.p.m. (0,4  $\mu$ g) de progestérone-7- $^3\text{H}$  (A.S. = 30 mC/mg) donnant un rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  initial de 14.

L'extrait benzénique final est amené à sec et appliqué sur chromatographie sur papier dans le système L/P.G. et chromatographié pendant 8 heures de façon à permettre au cholestérol-4- $^{14}\text{C}$  non métabolisé de s'écouler hors du papier. Quatre pics principaux de radioactivité ont été identifiés. Le pic I correspond aux stéroïdes les plus polaires (testostérone et 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone), le pic II correspond à l'androstènedione, le pic III à la progestérone et le pic IV au produit le moins polaire, probablement la prégnénolone et n'a pas été étudié.

#### Purification du pic I (fig. 19)

L'éluat de ce pic est rechromatographié dans le système B3 donnant un pic unique et uniforme. Après élution, le matériel radioactif est acétylé par l'anhydride acétique en milieu pyridinique et le produit acétylé chromatographié dans le système L/P.G. (le papier a été imprégné du mélange propylène-glycol-méthanol (2:1). Cette procédure permet d'obtenir deux pics : d'une part, un pic peu polaire ayant la même mobilité que l'acétate de testostérone (Ia), et un pic plus polaire correspondant à la mobilité de la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone (Ib).



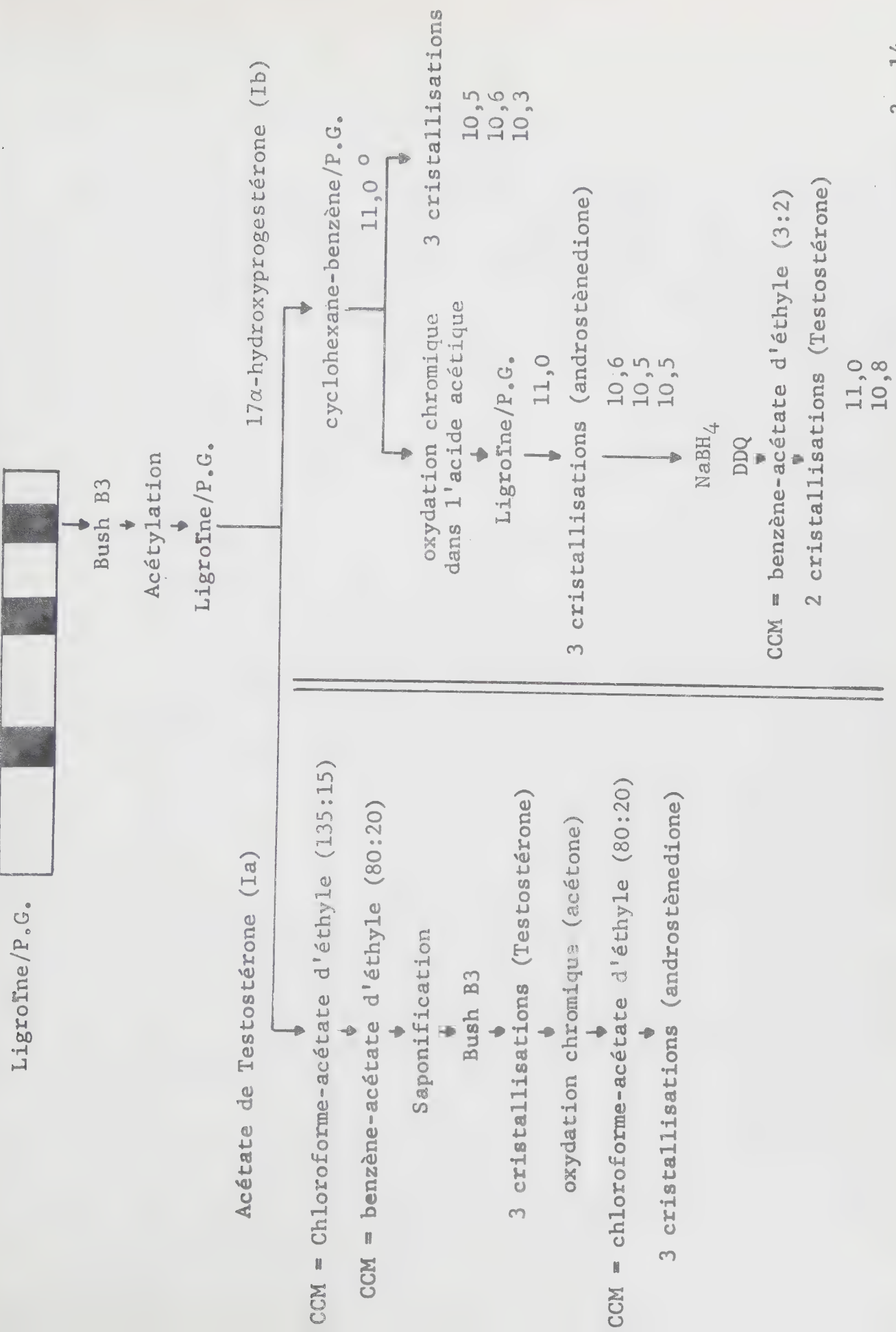


Fig. 19 - Protocole de Purification de la 17α-hydroxyprogesterone et de la testostérone.





### - Identification du pic Ia

La fraction correspondant à l'acétate de testostérone est purifiée par chromatographie en couche mince d'abord dans le système chloroforme-acétate d'éthyle (135:15) puis dans le système benzène-acétate d'éthyle (80:20). Après chaque chromatographie, un aliquote de 1/100 est prélevé pour mesure de la radioactivité. La récupération est de  $5 \times 10^6$  d.p.m. après la première chromatographie et de  $3,59 \times 10^6$  d.p.m. après la seconde chromatographie. Un aliquote correspondant à 1/8 de cette fraction est hydrolysé par la potasse en milieu méthanolique et l'hydrolysât chromatographié dans le système B3. La testostérone est éluée et 25 mg de testostérone froide ajoutés à l'éluat. Nous avons alors procédé à une cristallisation jusqu'à activité spécifique constante (Tableau VIII). Les cristaux et les liqueurs mères sont réunis et oxydés par l'acide chromique en milieu acétonique selon la technique de BOWERS et al. (7). L'androstènedione obtenue est purifiée sur chromatoplaque dans le système chloroforme-acétate d'éthyle (80:20) et cristallisée jusqu'à activité spécifique constante (Tableau VIII).

Il nous paraît important de signaler déjà ici que la testostérone et l'androstènedione obtenues par oxydation ne contiennent que du tritium.



TABLEAU .VIII.

|                           | SOLVANT           | ACTIVITE SPECIFIQUE<br>$^3\text{H}$ d.p.m./mg |
|---------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|
| Testostérone°             | Cristallisation 1 | 11.600                                        |
|                           | Eaux-mères        | 12.400                                        |
|                           | Cristallisation 2 | 11.500                                        |
|                           | Cristallisation 3 | 11.500                                        |
|                           | Cristallisation 1 | 11.600                                        |
|                           | Cristallisation 2 | 11.700                                        |
| Dérivé<br>androstènedione | Cristallisation 3 | 11.800                                        |

° : 1/8 de l'échantillon + 25 mg de testostérone

RECRISTALLISATION DE LA TESTOSTERONE ET DE SON DERIVE JUSQU'A ACTIVITE SPECIFIQUE CONSTANTE



### - Purification du pic Ib

La 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone est de nouveau purifiée dans le système CH.B/P.G.. Après prélèvement d'un aliquote de 1/100 pour comptage en scintillation liquide, nous obtenons un rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de 11,0. L'éluat est divisé ensuite en deux parties égales : la première moitié est directement cristallisée jusqu'à activité spécifique constante après addition de 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone froide (Tableau IX); la deuxième moitié de l'éluat est soumise à une oxydation chromique dans l'acide acétique. Elle provoque la formation d'androstènedione qui, après purification dans le système L/P.G. donne un rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de 11,0. Après addition de 19 mg d'androstènedione froide, le composé est cristallisé jusqu'à activité spécifique constante (Tableau IX). Les cristaux de la troisième cristallisation et les eaux-mères sont réunis et soumis à une réduction par le borohydrure de sodium puis à une oxydation par le DDQ (selon la technique de BOWERS et al.(8)). Cette méthode nous permet d'obtenir 8 mg de testostérone après purification sur chromatoplaque dans le système benzène-acétate d'éthyle (3:2). Ce dérivé est ensuite cristallisé (Tableau IX).

### Purification du pic II (fig. 20)

L'androstènedione est de nouveau purifiée dans le système B.A. et le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  obtenu est de 290,7. Après acétylation,



|                                             | CRISTALLISATION<br>n° | SOLVANT                   | ACTIVITE SPECIFIQUE d.p.m./mg. |                 | RAPPORT $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ |
|---------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------------------------|
|                                             |                       |                           | $^3\text{H}$                   | $^{14}\text{C}$ |                                    |
| a)<br>17 $\alpha$ -hydroxy-<br>progesterone | 1                     | Méthanol-éther            | 8.980                          | 858             | 10,5                               |
|                                             | 2                     | "                         | 9.080                          | 856             | 10,6                               |
|                                             | 3                     | "                         | 9.310                          | 899             | 10,3                               |
| b)<br>Dérivé<br>androstènedione             | 1                     | Acétone-hexane            | 4.020                          | 380             | 10,6                               |
|                                             | 2                     | "                         | 4.010                          | 378             | 10,5                               |
|                                             | 3                     | "                         | 3.970                          | 378             | 10,5                               |
| Dérivé<br>testostérone                      | 1                     | Ether-Ether de<br>pétrole | 4.170                          | 380             | 11,0                               |
|                                             | 2                     | "                         | 4.210                          | 390             | 10,8                               |

- a) La première moitié de l'échantillon a été cristallisée en tant que 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone
- b) La deuxième moitié a été oxydée par l'acide chromique en milieu acétique et l'androstènedione a été cristallisée. Ce stéroïde a été réduit en testostérone et recristallisé.

RECRISTALLISATION DE LA 17 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERONE ET DE SES DERIVES

JUSQU'A ACTIVITE SPECIFIQUE CONSTANTE.





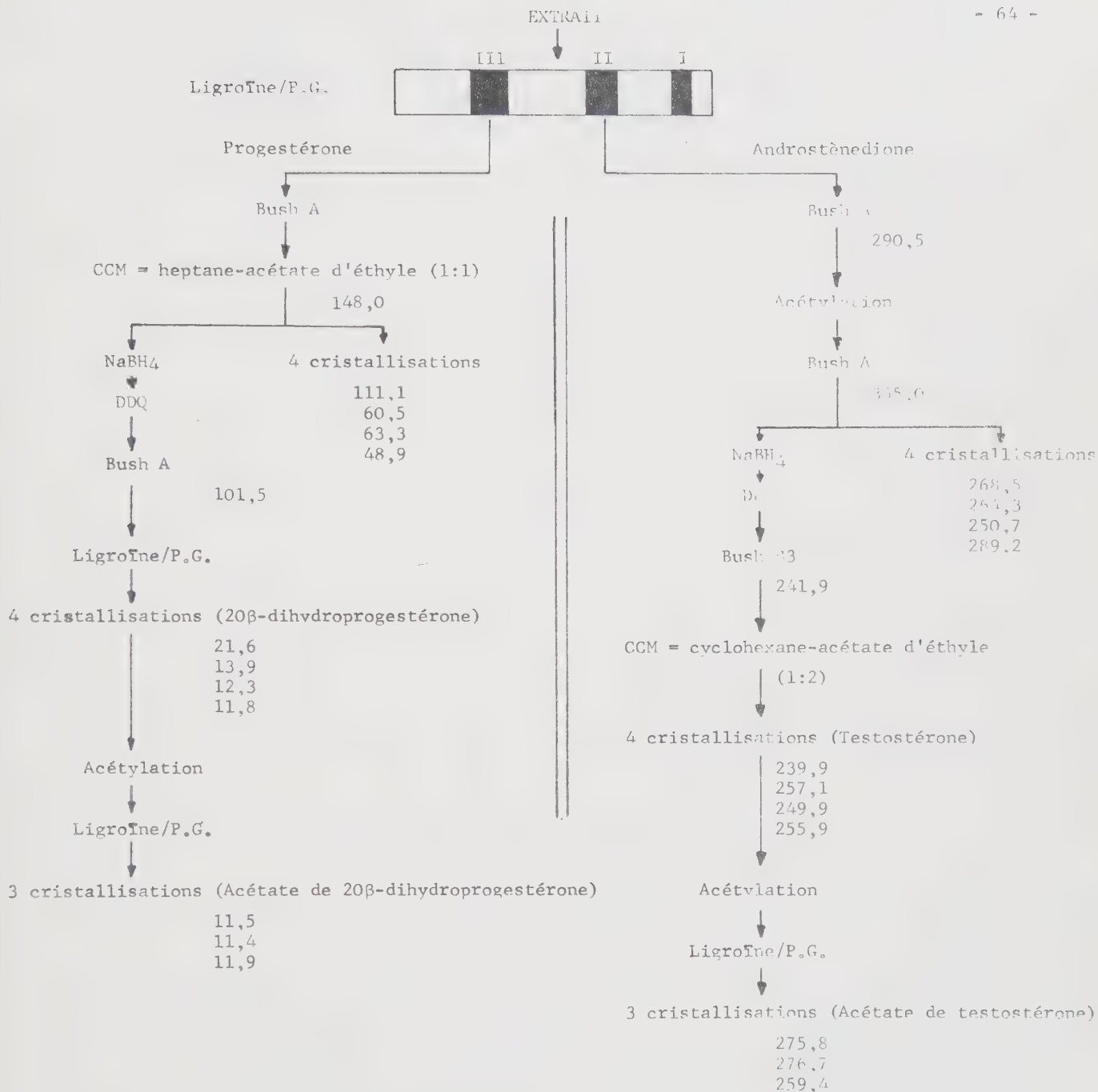


Fig. 20 - Protocole de Purification  
de l'androstènedione et de la progestérone.



le produit est de nouveau chromatographié dans le même système et nous n'observons pas de changement de la mobilité chromatographique. Le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  est alors égal à 355,0. Après addition à une moitié de l'extrait de 37 mg d'androstènedione froide, nous procédons à une cristallisation jusqu'à activité spécifique constante (Tableau X). La deuxième moitié est réduite par le borohydrure de sodium, puis oxydée par le DDQ. La testostérone obtenue est purifiée dans le système B3 donnant un rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de 241,9, puis en chromatographie sur couche mince dans le système cyclohexane-acétate d'éthyle (1:2). Après addition de 39 mg de testostérone froide à cet éluat, nous procédons à une nouvelle cristallisation jusqu'à activité spécifique constante (Tableau X). Les cristaux de la quatrième cristallisation sont remis en solution, acétylés, puis purifiés par chromatographie dans le système L/P.G. et cristallisés (Tableau X).

#### Purification du pic III (fig. 20)

L'éluat de la zone de la progestérone est purifié par chromatographie sur papier dans le système B3 et la radioactivité de l'éluat mesurée. Le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  est alors de 140,5. Ensuite, nous procédons à une purification sur chromatoplaque dans le système heptane-acétate d'éthyle (1:1) et nous obtenons un rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de 148,0. A une moitié de l'éluat, nous ajoutons



|                                      | CRISTALLISATION | SOLVANT                   | ACTIVITE SPECIFIQUE d.p.m./mg. |                 | RAPPORT $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ |
|--------------------------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------------------------|
|                                      |                 |                           | $^3\text{H}$                   | $^{14}\text{C}$ |                                    |
| a)<br>Androstènedione                | 1               | Acétone-hexane            | 82.200                         | 306             | 268,5                              |
|                                      | 2               | "                         | 81.400                         | 308             | 264,3                              |
|                                      | 3               | "                         | 81.500                         | 325             | 250,7                              |
|                                      | 4               | "                         | 78.400                         | 271             | 289,2                              |
| b)<br>Dérivé<br>testostérone         | 1               | Méthanol-éther            | 48.000                         | 200             | 239,9                              |
|                                      | 2               | "                         | 47.700                         | 185             | 257,7                              |
|                                      | 3               | "                         | 46.700                         | 187             | 249,9                              |
|                                      | 4               | "                         | 45.800                         | 179             | 255,9                              |
| Dérivé<br>acétate de<br>testostérone | 1               | Ether-Ether de<br>pétrole | 45.200                         | 164             | 275,8                              |
|                                      | 2               | "                         | 47.200                         | 172             | 276,7                              |
|                                      | 3               | "                         | 46.200                         | 178             | 254,4                              |

a) La première moitié de l'échantillon a été cristallisée en tant que androstènedione  
 b) La deuxième moitié a été réduite en testostérone et cristallisée. Puis, le stéroïde a été acétylé et recristallisé.

RECRISTALLISATION DE L'ANDROSTENEDIONE ET DE SES  
 DERIVES JUSQU'A ACTIVITE SPECIFIQUE CONSTANTE.



38 mg de progestérone froide et réalisons quatre cristallisations sans aboutir à une activité spécifique constante (Tableau XI). La deuxième moitié de l'extrait est traitée par  $\text{NaBH}_4$  puis par le DDQ. La 20 $\beta$ -dihydroprogestérone obtenue est purifiée en chromatographie sur papier dans le système B.A. donnant un rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de 101,5. Une nouvelle purification est réalisée par chromatographie sur papier dans le système L/P.G. avec un rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de 85,0. Après addition de 19 mg de 20 $\beta$ -dihydroprogestérone froide, nous réalisons une cristallisation jusqu'à activité spécifique constante donnant un rapport voisin de 12 (Tableau XI). Le produit de la quatrième cristallisation est acétylé, purifié dans le système L/P.G. et cristallisé (Tableau XI).

2. Incubation de la préparation mitochondriale avec de la progestérone-7 $\alpha$ - $^3\text{H}$  et de la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone-4- $^{14}\text{C}$

Alors que dans l'expérience précédente, l'incubation a été réalisée pendant deux heures, il nous a paru intéressant de comparer le rendement des métabolites obtenus après 30 minutes et 120 minutes d'incubation. En effet, il est possible que d'une part les processus enzymatiques d'une des voies métaboliques s'effectuent à une vitesse plus grande que ceux des





|                                                      | CRISTALLISATION<br>n° | SOLVANT                   | ACTIVITE SPECIFIQUE d.p.m./mg |                 | RAPPORT $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ |
|------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------------|
|                                                      |                       |                           | $^3\text{H}$                  | $^{14}\text{C}$ |                                    |
| a)<br>Progesterone                                   | 1                     | acétone-hexane            | 19.600                        | 180             | 111,1                              |
|                                                      | 2                     | "                         | 11.400                        | 190             | 60,5                               |
|                                                      | 3                     | "                         | 11.800                        | 187             | 63,3                               |
|                                                      | 4                     | "                         | 9.500                         | 195             | 48,9                               |
| b)<br>Dérivé<br>20β-dihydro-<br>progesterone         | 1                     | "                         | 6.600                         | 305             | 21,6                               |
|                                                      | 2                     | "                         | 4.400                         | 317             | 13,9                               |
|                                                      | 3                     | "                         | 3.900                         | 317             | 12,3                               |
|                                                      | 4                     | "                         | 3.700                         | 315             | 11,8                               |
| Dérivé<br>Acétate de<br>20β-dihydro-<br>progesterone | 1                     | éther-éther de<br>pétrole | 3.700                         | 322             | 11,5                               |
|                                                      | 2                     | "                         | 3.800                         | 330             | 11,4                               |
|                                                      | 3                     | "                         | 3.800                         | 320             | 11,9                               |

a) la première moitié de l'échantillon a été cristallisée en tant que progesterone  
 b) la deuxième moitié a été réduite et cristallisée en tant que 20β-dihydroprogesterone.  
 Après acétylation, l'acétate a été recristallisé.

RECRISTALLISATION DE LA PROGESTERONE ET DE SES  
 DERIVES JUSQU'A ACTIVITE SPECIFIQUE CONSTANTE.



autres voies métaboliques et que d'autre part, l'éventuelle production d'acétate de testostérone puisse être plus facilement détectée après un temps court d'incubation, ce composé pouvant être facilement hydrolysé par les estérases habituellement contenues dans un complexe enzymatique.

Ces incubations ont été réalisées en présence de  $30,3 \times 10^6$  d.p.m. (0,4  $\mu$ g) de progestérone-7- $^3\text{H}$  (A.S. = 30  $\mu\text{C}/\mu\text{g}$ ) et de  $1,65 \times 10^6$  d.p.m. (19  $\mu$ g) de 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone-4- $^{14}\text{C}$  (A.S. = 40  $\mu\text{C}/\text{mg}$ ) donnant un rapport initial  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de 18,3. L'une des incubations réalisée sans addition de tissu n'a montré ni modification ni décomposition des substrats.

L'extrait final de cette incubation est tout d'abord purifié en chromatographie sur papier dans le système L/P.G. après addition de 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, de testostérone, d'androstènedione et d'acétate de testostérone froide. Les trois pics correspondant aux zones absorbant dans l'U.V. sont élués.

#### Purification du premier pic (fig. 21)

L'éluat est acétylé et rechromatographié dans le système L/P.G. révélant 5 pics radioactifs, le plus polaire correspondant à la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone et le moins polaire à l'acétate de testostérone. Seuls ces deux métabolites ont été élués.



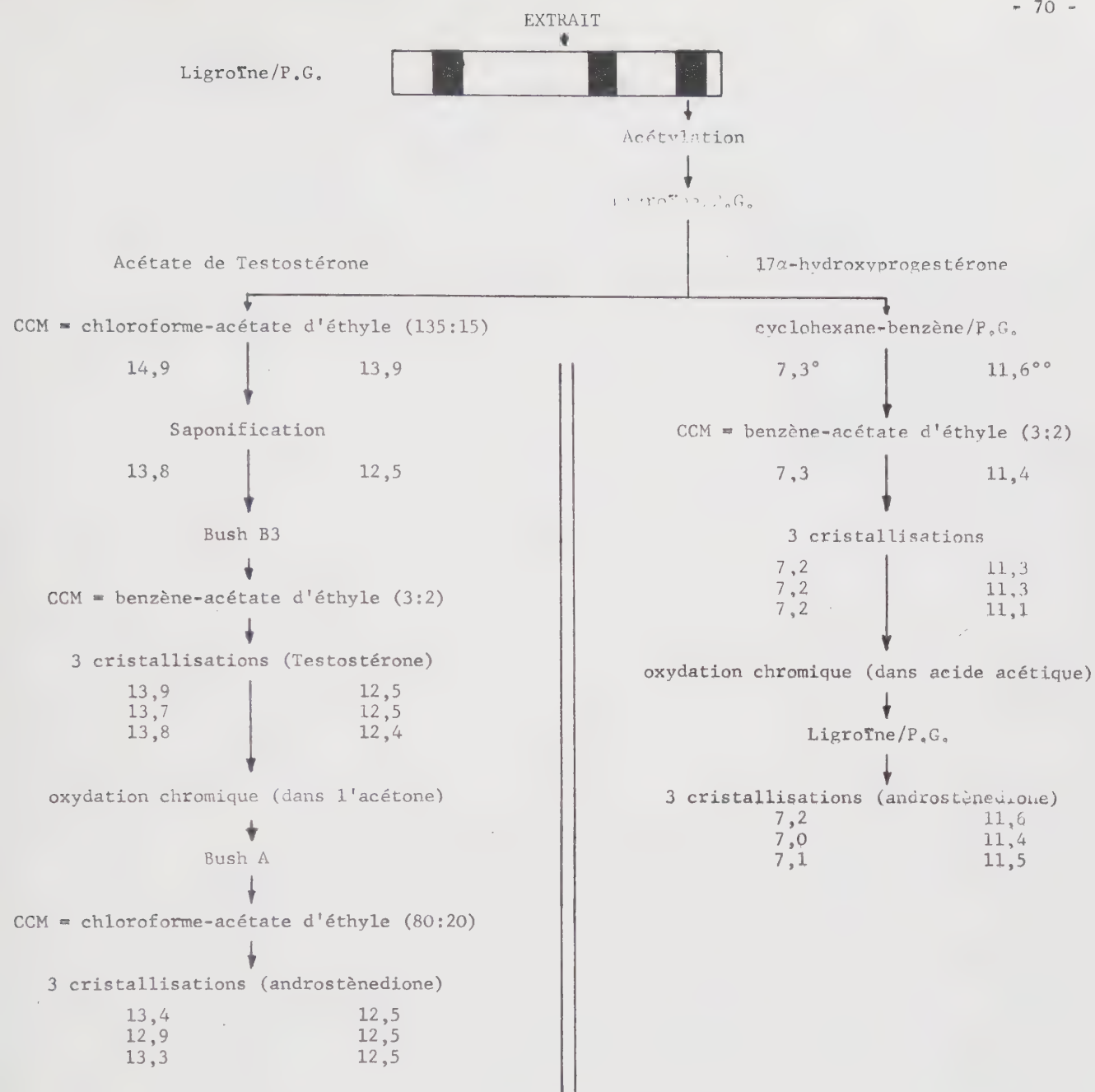


Fig. 21 - Protocole de Purification  
de la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone et de la testostérone.

° : incubation de 30 min.  
°° : incubation de 120 min.



- Identification de la 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone : après chromatographie sur papier dans le système CH.B./P.G., le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  est calculé. Il est égal à 7,30 pour l'incubation de 30 minutes et à 11,6 pour celle de 120 minutes. L'extrait est alors purifié par chromatographie en couche mince dans le système benzène-acétate d'éthyle (3:2) et le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de nouveau calculé : 7,3 pour l'incubation de 30 minutes et 11,14 pour l'incubation de 120 minutes. Après addition de 30 mg de substance froide, l'extrait est cristallisé (Tableau XII). Le produit de la dernière cristallisation est oxydé par l'acide chromique en milieu acétique et l'androstènedione obtenue est purifiée dans le système L/P.G., puis cristallisée jusqu'à activité spécifique constante (Tableau XII).

- Identification de la testostérone : l'extrait est chromatographié sur chromatoplaque dans le système chloroforme-acétate d'éthyle (135:15) et le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  calculé : 14,9 (incubation de 30 minutes) et 13,9 (incubation de 120 minutes). Après saponification et nouvelle chromatographie dans le système B3, le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  est de nouveau calculé : 13,8 (incubation de 30 minutes) et 12,5 (incubation de 120 minutes).

Nous procédons à trois cristallisations successives après addition de 30 mg de stéroïde froid (Tableau XIII). Le produit de la troisième cristallisation est ensuite oxydé par l'acide





TABLEAU .XII.

|                                       | Durée<br>d'incu-<br>bation<br>(minutes) | CRISTALLISATION:<br>n° | SOLVANT        | ACTIVITE SPECIFIQUE d.p.m./mg. RAPPORT: |                 |                            |
|---------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|----------------|-----------------------------------------|-----------------|----------------------------|
|                                       |                                         |                        |                | $^3\text{H}$                            | $^{14}\text{C}$ | $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ |
| 17 $\alpha$ -hydroxy-<br>progestérone | 30                                      | 1                      | Acétone-hexane | 91.800                                  | 12.700          | 7,2                        |
|                                       |                                         | 2                      | "              | 92.000                                  | 12.800          | 7,2                        |
|                                       |                                         | 3                      | "              | 89.000                                  | 12.300          | 7,2                        |
| Dérivé                                | 30                                      | 1                      | "              | 36.400                                  | 3.210           | 11,3                       |
|                                       |                                         | 2                      | "              | 33.300                                  | 2.920           | 11,4                       |
|                                       |                                         | 3                      | "              | 35.700                                  | 3.210           | 11,1                       |
| androstènedione                       | 120                                     | 1                      | "              | 89.800                                  | 12.400          | 7,2                        |
|                                       |                                         | 2                      | "              | 90.500                                  | 13.000          | 7,0                        |
|                                       |                                         | 3                      | "              | 89.700                                  | 12.500          | 7,1                        |
|                                       | 120                                     | 1                      | "              | 33.200                                  | 2.870           | 11,6                       |
|                                       |                                         | 2                      | "              | 32.800                                  | 2.890           | 11,4                       |
|                                       |                                         | 3                      | "              | 32.700                                  | 2.840           | 11,5                       |

RECRISTALLISATION DE LA 17 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERONE ET DE SON DERIVE

(ANDROSTENEDIONE) JUSQU'A ACTIVITE SPECIFIQUE CONSTANTE.



TABLEAU .XIII.

|                           | Durée<br>d'incu-<br>bation<br>(minutes) | CRISTALLISATION:<br>n° | SOLVANT                   | ACTIVITE SPECIFIQUE d.p.m./mg |                 | RAPPORT<br>$\frac{^3\text{H}}{^{14}\text{C}}$ |
|---------------------------|-----------------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------|
|                           |                                         |                        |                           | $^3\text{H}$                  | $^{14}\text{C}$ |                                               |
| Testostérone              | 30                                      | 1                      | Ether                     | 17.400                        | 1.260           | 13,9                                          |
|                           |                                         | 2                      | Acétone-hexane            | 18.000                        | 1.230           | 13,7                                          |
|                           |                                         | 3                      | "                         | 17.300                        | 1.230           | 13,8                                          |
|                           | 120                                     | 1                      | Ether-Ether de<br>pétrole | 22.600                        | 1.800           | 12,5                                          |
|                           |                                         | 2                      | Acétone-hexane            | 22.400                        | 1.800           | 12,5                                          |
|                           |                                         | 3                      | "                         | 22.500                        | 1.810           | 12,4                                          |
| Dérivé<br>androsténédione | 30                                      | 1                      | "                         | 16.200                        | 1.210           | 13,4                                          |
|                           |                                         | 2                      | "                         | 15.500                        | 1.200           | 12,9                                          |
|                           |                                         | 3                      | "                         | 16.900                        | 1.260           | 13,3                                          |
|                           | 120                                     | 1                      | "                         | 22.000                        | 1.760           | 12,5                                          |
|                           |                                         | 2                      | "                         | 22.000                        | 1.760           | 12,5                                          |
|                           |                                         | 3                      | "                         | 22.400                        | 1.800           | 12,5                                          |

RECRISTALLISATION DE LA TESTOSTERONE ET DE SON DERIVE  
(ANDROSTENEDIONE) JUSQU'A ACTIVITE SPECIFIQUE CONSTANTE.



chromique en milieu acétonique et l'androstènedione produite, cristallisée jusqu'à activité spécifique constante (Tableau XII).

#### Purification du deuxième pic radioactif (fig. 22)

L'éluat de ce deuxième pic est acétylé de façon à se débarrasser de tout le matériel acétylable et chromatographié dans le système B.A., permettant d'individualiser un pic polaire correspondant à l'androstènedione. Le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  pour ce stéroïde a été alors calculé : 12,7 (incubation de 30 minutes) et 12,4 (incubation de 120 minutes). L'extrait est ensuite chromatographié sur chromatoplaque dans le système chloroforme-acétate d'éthyle (80:20) et le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  calculé : 12,7 (incubation de 30 minutes) et 12,3 (incubation de 120 minutes). Après addition de 30 mg d'androstènedione froide à une moitié de l'échantillon, nous procédons à trois cristallisations successives (Tableau XIV). La fraction restante de l'éluat est réduite en androsta-4-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol par  $\text{NaBH}_4$ , puis reoxydée en position 3 $\beta$  par le DDQ. La testostérone produite est d'abord purifiée sur chromatoplaque dans le système benzène-acétate d'éthyle (3:2) et ensuite dans le système B3. Nous procédons à trois cristallisations successives (Tableau XIV). Le produit de la troisième cristallisation est acétylé, puis purifié sur chromatoplaque dans le système chloroforme-acétate d'éthyle (135:15) et recristallisé jusqu'à activité spécifique constante (Tableau XIV).



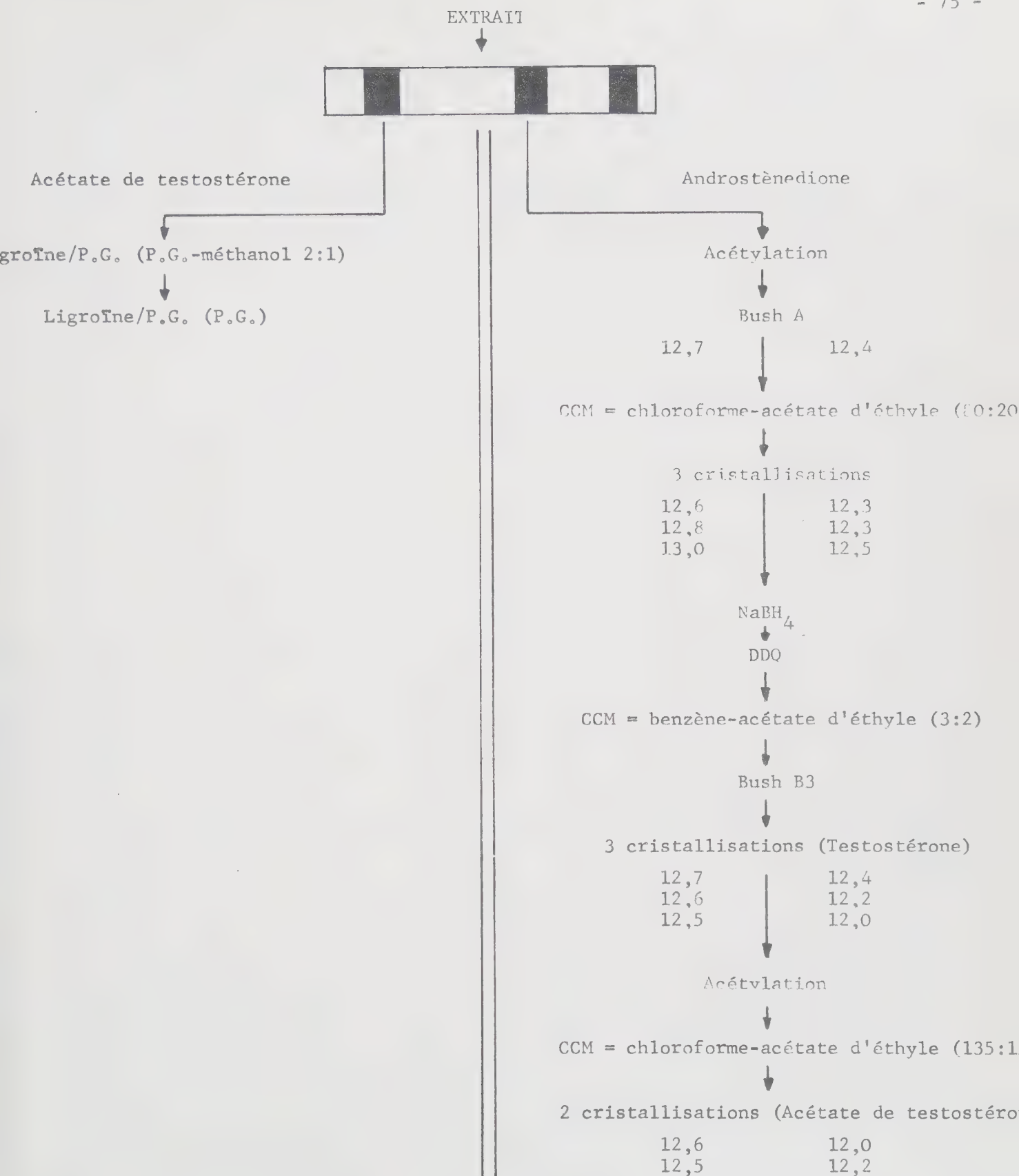


Fig. 22 - Protocole de Purification

de l'androstènedione et de l'acétate de testostérone.





|                                      | Durée<br>d'incu-<br>bation<br>(minutes) | CRISTALLISATION:<br>n° | SOLVANT                   | ACTIVITE SPECIFIQUE d.p.m./mg |                 |                            | RAPPORT: |
|--------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|----------------------------|----------|
|                                      |                                         |                        |                           | $^3\text{H}$                  | $^{14}\text{C}$ | $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ |          |
| Androstènedione                      | 30                                      | 1                      | Acétone-hexane            | 58.400                        | 4.620           |                            | 12,6     |
|                                      |                                         | 2                      | "                         | 58.200                        | 4.540           |                            | 12,8     |
|                                      |                                         | 3                      | "                         | 58.100                        | 4.480           |                            | 13,0     |
|                                      | 120                                     | 1                      | "                         | 115.300                       | 9.370           |                            | 12,3     |
|                                      |                                         | 2                      | "                         | 113.300                       | 9.230           |                            | 12,3     |
|                                      |                                         | 3                      | "                         | 110.700                       | 8.850           |                            | 12,5     |
| Dérivé<br>testostérone               | 30                                      | 1                      | Ether-Ether de<br>pétrole | 45.000                        | 3.530           |                            | 12,7     |
|                                      |                                         | 2                      | "                         | 45.000                        | 3.580           |                            | 12,6     |
|                                      |                                         | 3                      | "                         | 44.000                        | 3.520           |                            | 12,5     |
|                                      | 120                                     | 1                      | "                         | 93.200                        | 7.500           |                            | 12,4     |
|                                      |                                         | 2                      | "                         | 89.900                        | 7.350           |                            | 12,2     |
|                                      |                                         | 3                      | "                         | 91.800                        | 7.650           |                            | 12,0     |
| Dérivé acétate<br>de<br>testostérone | 30                                      | 1                      | "                         | 43.400                        | 3.450           |                            | 12,6     |
|                                      |                                         | 2                      | "                         | 42.600                        | 3.400           |                            | 12,5     |
|                                      | 120                                     | 1                      | "                         | 85.800                        | 7.140           |                            | 12,0     |
|                                      |                                         | 2                      | "                         | 88.500                        | 7.270           |                            | 12,2     |

RECRISTALLISATION DE L'ANDROSTENEDIONE ET DE SES DERIVES  
JUSQU'A ACTIVITE SPECIFIQUE CONSTANTE.



### Purification du troisième pic (fig. 22)

L'éluat de ce pic est rechromatographié deux fois dans le système L/P.G.. La première fois le papier est imprégné de méthanol-propylène-glycol (2:1), la deuxième fois, de propylène-glycol seul pour ralentir la migration. La substance absorbant dans l'U.V. et correspondant à la mobilité de l'acétate de testostérone perd progressivement toute sa radioactivité démontrant l'absence d'acétate de testostérone radioactif dans le milieu d'incubation.

### 3. Incubation de la préparation mitochondriale soit avec de la testostérone soit avec de l'androstènedione marquées au $^{14}\text{C}$

Comme dans l'expérience précédente, deux séries d'incubation ont été réalisées pendant 30 minutes et 120 minutes. Celles-ci ont été effectuées, soit en présence de  $4,7 \times 10^5$  d.p.m. ( $3 \mu\text{g}$ ) de testostérone-4- $^{14}\text{C}$  (A.S. =  $70 \mu\text{C}/\text{mg}$ ), soit en présence de  $4,6 \times 10^5$  d.p.m. d'androstènedione (A.S. identique), ce qui représente donc deux séries d'incubations différentes comportant deux béchers par série. A la fin de chaque incubation, nous avons ajouté  $5,9 \times 10^5$  d.p.m. de testostérone-1,2- $^3\text{H}$  et  $1,6 \times 10^6$  d.p.m. d'androstènedione-1,2- $^3\text{H}$ , dans chaque bécher, de façon à pouvoir apporter les corrections nécessaires pour les pertes



expérimentales, tant pour la testostérone que pour l'androstènedione produites ou non métabolisées. L'une des incubations de 120 minutes a été réalisée sans addition de tissu. Aucune transformation du substrat n'a été détectée.

L'extrait final est tout d'abord purifié dans le système L/P.G. après addition de testostérone et d'androstènedione froides. Trois pics de radioactivité sont identifiés, le plus et le moins polaire correspondant respectivement à la testostérone et à l'androstènedione.

- Purification de l'androstènedione : l'éluat est tout d'abord soumis à une acétylation, puis chromatographié sur chromatoplaque dans le système chloroforme-acétate d'éthyle (80:20). Comme précédemment, l'androstènedione est soumise à l'action de  $\text{NaBH}_4$  puis du DDQ et la testostérone formée, purifiée dans le système B3. Après chromatographie en couche mince dans le système benzène-acétate d'éthyle (3:2), nous procédons à plusieurs cristallisations jusqu'à obtenir un rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  constant (Tableau XV).

- Purification de la testostérone : l'éluat a d'abord été purifié par chromatographie sur papier dans le système CH.B./P.G. puis acétylé et purifié sur chromatoplaque dans le système chloroforme-acétate d'éthyle (135:15). Après addition de 30 mg d'acétate de testostérone, nous effectuons une cristallisation jusqu'à obtenir un rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  constant (Tableau XV).



| DUREE<br>D'INCUBATION<br>(minutes) | SUBSTRAT        | TESTOSTERONE |                 | ANDROSTENEDIONE |                 |
|------------------------------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                    |                 | Produite     | Non transformée | Produite        | Non transformée |
| 30                                 | Androstènedione | 3,12         |                 |                 | 2,48            |
|                                    |                 | 3,13         |                 |                 | 2,51            |
|                                    |                 | 3,04         |                 |                 | 2,46            |
|                                    |                 | 3,09         |                 |                 | 2,44            |
|                                    | Testostérone    |              | 1,79            | 42,84           |                 |
|                                    |                 |              | 1,78            | 44,00           |                 |
|                                    |                 |              | 1,75            | 41,72           |                 |
|                                    |                 |              | 1,74            | 42,75           |                 |
| 120                                | Androstènedione | 3,01         |                 |                 | 3,17            |
|                                    |                 | 3,02         |                 |                 | 3,15            |
|                                    |                 | 2,98         |                 |                 | 3,12            |
|                                    |                 | 2,95         |                 |                 | 3,13            |
|                                    | Testostérone    |              | 2,88            | 18,16           |                 |
|                                    |                 |              | 2,93            | 17,92           |                 |
|                                    |                 |              | 2,86            | 18,27           |                 |
|                                    |                 |              | 2,86            | 17,78           |                 |

RAPPORT  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  AU COURS DE 4 ETAPES SUCCESSIVES DE LA PURIFICATION.





Le Tableau XVI présente les résultats de la transformation de l'androstènedione en testostérone et de la testostérone en androstènedione. Après 30 minutes d'incubation, 20 % de l'androstènedione sont transformés en testostérone alors que 70 % n'ont pas été métabolisés : 8 % de la testostérone ont été transformés en androstènedione alors que 71,1 % n'ont pas été transformés. Après 120 minutes d'incubation, la conversion s'élève à 20,7 % dans le sens androstènedione  $\longrightarrow$  testostérone et à 19,4 % dans le sens inverse.

- Purification du pic intermédiaire (moins polaire que la testostérone et plus polaire que l'androstènedione)

L'éluat de ce pic est chromatographié dans le système cyclohexane-benzène/propylène-glycol pendant six heures, puis sur chromatoplaque dans le système benzène-acétate d'éthyle (70:30). Ces deux chromatographies nous permettent d'éliminer la présence soit d'androstérone, soit d'étiocholanolone. L'extrait est alors soumis à une précipitation par la digitonine et la fraction contenant les 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes, séparée de la fraction non précipitable. La radioactivité est alors mesurée sur un aliquote de chaque fraction. A un aliquote de la fraction contenant les 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes, nous avons ajouté de l'épiandrostérone froide et nous avons pu réaliser une cristallisation jusqu'à activité spécifique constante prouvant ainsi la formation d'épiandrostérone au cours de l'incubation.



TABLEAU .XVI.

| DUREE<br>D'INCUBATION<br>(minutes) | SUBSTRAT        | TESTOSTERONE |                 | ANDROSTENEDIONE |                 |
|------------------------------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                    |                 | Produite     | Non transformée | Produite        | Non transformée |
| 30                                 | Androstènedione | 19,8 °       |                 |                 | 69,5            |
|                                    | Testostérone    |              | 71,1            | 8,0             |                 |
| 120                                | Androstènedione | 20,7         |                 |                 | 54,1            |
|                                    | Testostérone    |              | 43,3            | 19,4            |                 |

° : Résultat correspondant à la dernière cristallisation et exprimé en pourcentage de la radioactivité initiale du substrat.

TRANSFORMATION DE L'ANDROSTENEDIONE EN TESTOSTERONE  
ET DE LA TESTOSTERONE EN ANDROSTENEDIONE.



La fraction non précipitable est représentée soit par le 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-3-one, soit par son isomère 5 $\beta$ , soit par un mélange de ces deux corps. Leur identification n'a pu être réalisée, du fait de la faible quantité de ces produits.

#### 4. Mesure de la consommation de NADPH par la préparation mitochondriale

Au cours d'une expérience réalisée dans les mêmes conditions, nous avons effectué une incubation en présence

a : de 5  $\mu$ g de testostérone

b : de la même quantité d'androstènedione

c : sans addition de substrat

Un aliquote de 0,6 ml a été prélevé à 15, 30, 60 et 120 minutes. Nous avons procédé à l'extraction de NADPH selon la technique de GLOCK et Mc LEAN (60). L'aliquote est introduit dans un homogénéiseur Potter contenant 5 ml de NaOH 1N placé dans de l'eau bouillante et gardé à cette température pendant 5 minutes; puis on procède à l'homogénéisation pendant 1 minute 1/2. On refroidit dans un bain de glace, on neutralise avec HCl 0,1N. On complète à 10 ml. On centrifuge à 20.000 x g. pendant 30 minutes et on prélève le surnageant pour mesurer le NADPH résiduel à l'aide d'un spectrographe enregistreur PERKIN-ELMER.



La figure 23b représente les courbes obtenues avec des quantités croissantes de NADPH (Sigma Chemical Co.). La figure 23a représente la valeur de l'absorption en fonction des quantités croissantes de NADPH. Nous voyons que les points se situent le long d'une droite. Sur la figure 24, nous avons reproduit respectivement les courbes obtenues en présence de testostérone, d'androstènedione et enfin sans substrat. On voit déjà que toutes ces courbes sont à peu près similaires. Sur le Tableau XVII, nous avons rapporté les résultats de la consommation de NADPH au cours des différents temps d'incubation. La consommation du coenzyme augmente avec le temps mais elle est très peu différente en présence ou en l'absence de substrat.

#### d) Discussion

Ainsi que nous l'avons décrit dans le chapitre traitant de l'historique du métabolisme testiculaire, deux voies majeures ont été jusqu'à ce jour identifiées. Dans la première voie, la prégnénolone est transformée en  $17\alpha$ -hydroxyprégnénolone, puis en déhydroépiandrosterone et peut-être en androsta-5-ène- $3\beta,17\beta$  diol avec, à chaque étape, une entrée possible vers la seconde voie sous l'influence d'une 3-cétostéroïde  $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomérase et d'une  $3\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase. La seconde voie qui est commune à toutes les glandes stéroïdogènes est principalement





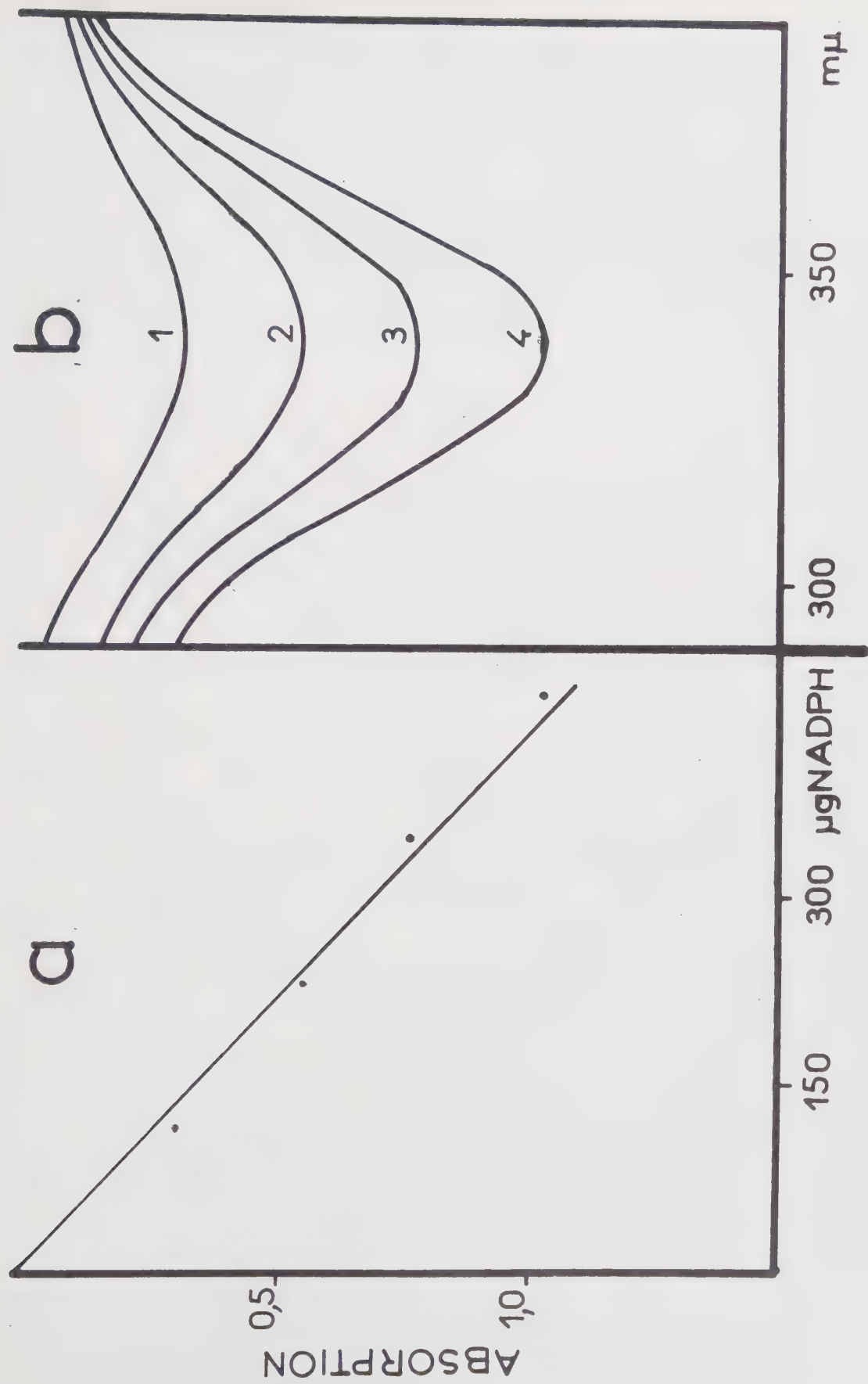


Fig. 23 Mesure de l'absorption de NADPH en fonction de sa concentration : (a) courbe; (b) enregistrement graphique - Perkin Elmer UV 202 (réfrence : eau, pH 7; vitesse de déroulement : lente; fente : 80)。



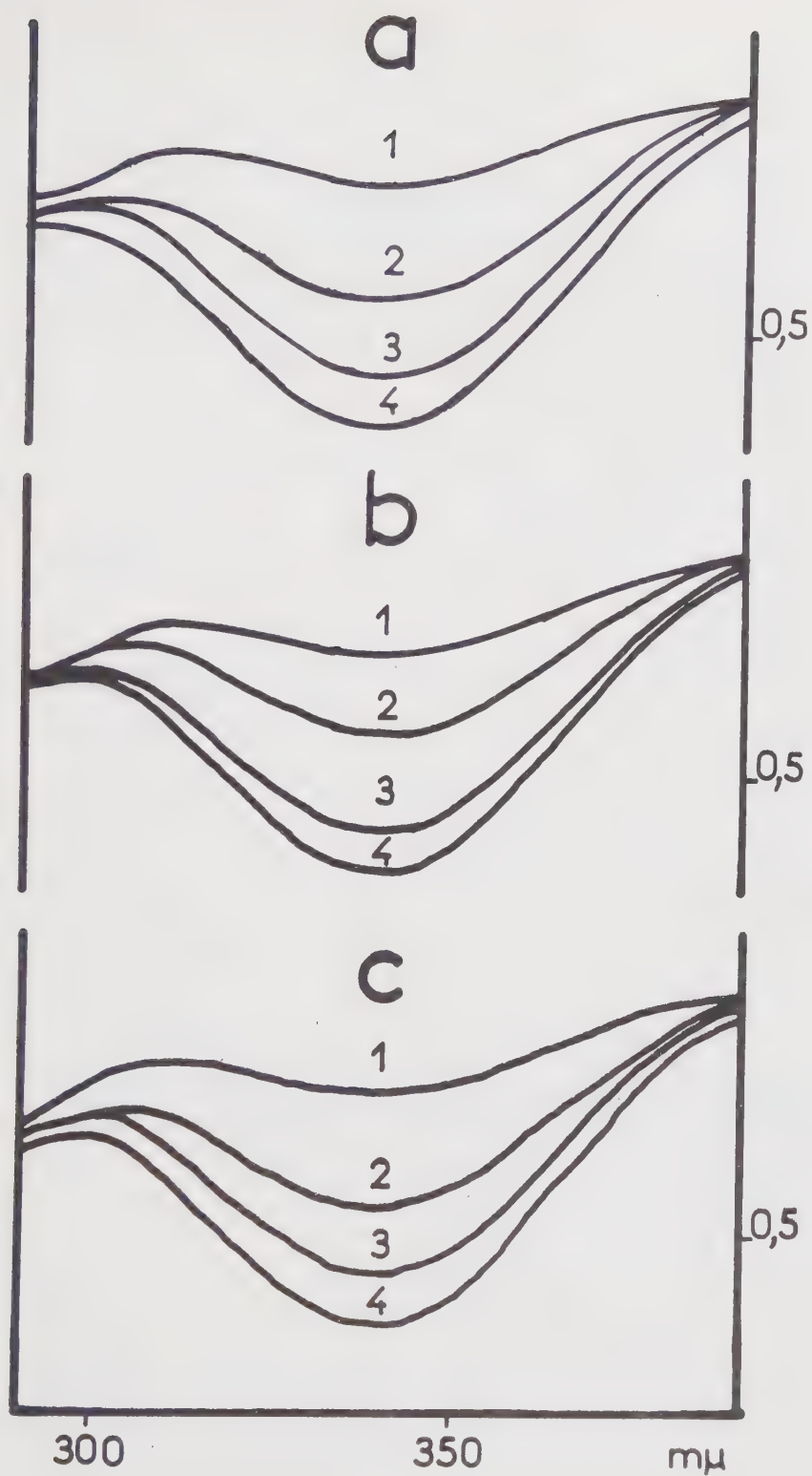


Fig. 24 Consommation de NADPH en présence de 5  $\mu$ g de  
testostérone (a), de 5  $\mu$ g d'androstènedione (b) et  
sans substrat exogène (c).



TABLEAU .XVII.

| SUBSTRAT        | DUREE D'INCUBATION (Minutes) |       |       |       |
|-----------------|------------------------------|-------|-------|-------|
|                 | 15                           | 30    | 60    | 120   |
| Testostérone    | 6.000                        | 6.300 | 6.730 | 7.300 |
| Androstènedione | 6.040                        | 6.240 | 6.780 | 7.180 |
| 0               | 6.040                        | 6.360 | 6.690 | 7.270 |

QUANTITE DE NADPH OXYDE PENDANT L'INCUBATION (µg)



représentée par la séquence suivante : la progestérone est transformée en 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone qui est elle-même convertie en androstènedione, transformée reversiblement en testostérone. Cependant, les résultats obtenus après incubation de cholestérol-4-<sup>14</sup>C et de progestérone-7 $\alpha$ -<sup>3</sup>H ne peuvent être expliqués sur la base de ces deux voies. En effet, la testostérone n'est marquée que par le tritium bien que la conversion soit de l'ordre de 8,3 %. De plus, le rapport <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C pour l'androstènedione (265) est très différent de celui trouvé pour la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone et la progestérone (  $\approx$  11) suggérant une contribution de la progestérone dans le contenu en tritium de l'androstènedione. Ces divergences dans les rapports <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C pourraient être expliquées par une voie directe allant de la progestérone à la testostérone ainsi que cela a été suggéré par FORCHIELLI et al. (53). Cependant, nous n'avons jamais pu isoler d'acétate de testostérone à l'encontre de sa mise en évidence par FONKEN et al. (51) par incubation avec Cladosporium resinae. Il faut aussi mentionner les expériences de KASE et al. (86-88) qui, incubant de la progestérone-7-<sup>3</sup>H et de la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone-4-<sup>14</sup>C avec des homogénats d'ovaires humains normaux ou polykystiques isolent de la testostérone dont le rapport <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C est plus élevé que celui de l'androstènedione. Ces expériences suggèrent la possibilité de formation de testostérone à partir de la progestérone sans formation préalable d'androstènedione.





Cependant, les résultats obtenus après incubation de progestérone- $7\alpha$ - $^3\text{H}$  et de  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone- $4$ - $^{14}\text{C}$  jettent un doute sur l'interprétation de ces résultats. Après 30 minutes d'incubation, les rapports  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  des trois principaux métabolites isolés sont différents. Alors que le rapport est de 7,2 pour la  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone, il est plus élevé pour l'androstènedione (12,5) et la testostérone possède le rapport le plus élevé (13,3). Ces résultats peuvent aussi s'expliquer sur la base d'une voie directe allant de la progestérone à la testostérone, voie dans laquelle les processus enzymatiques agissent à une vitesse plus grande que dans les deux autres voies, étant donné que la testostérone contient plus de tritium que l'androstènedione et beaucoup plus que la  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone. Mais, après 120 minutes d'incubation, les rapports tendent à s'égaliser ( # 12), laissant à penser qu'après un certain temps d'incubation un équilibre progressif s'établit entre l'androstènedione et la testostérone par l'intermédiaire d'une voie plus lente mais plus efficace passant par la  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone.

Néanmoins, une autre explication mettant en jeu la polarité des substrats doit être aussi discutée. En effet, si le système enzymatique nécessaire à ces processus métaboliques est localisé non pas à la surface des particules mais à l'intérieur de celles-ci, le substrat aura à traverser la membrane



mitochondriale afin d'être métabolisé. La progestérone étant moins polaire aura moins de difficultés à traverser la membrane lipoprotéique que la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone (75). Cette hypothèse permettrait d'expliquer le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  croissant de la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone à la testostérone après 30 minutes d'incubation. Cependant, il faut alors penser qu'après 120 minutes d'incubation, une quantité suffisante de 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone a pénétré à l'intérieur de la mitochondrie pour être métabolisée à la même vitesse que la progestérone; il n'en reste pas moins que l'expérience précédente n'est pas en accord complet avec cette hypothèse. Le cholestérol étant moins polaire que la progestérone, il pourrait sembler paradoxal de trouver plus de  $^3\text{H}$  que de  $^{14}\text{C}$  fixé sur l'androstènedione et la testostérone. Cette constatation peut être expliquée d'une part, par le fait que le cholestérol est situé bien plus haut que la progestérone dans la chaîne métabolique et que, d'autre part, le pool endogène du cholestérol mitochondrial est très élevé (260  $\mu\text{g}$  par équivalent gramme de tissu frais). On peut dès lors penser que pendant le temps nécessaire à la progestérone pour traverser la membrane mitochondriale, le cholestérol arrive plus tard au niveau des sites actifs enzymatiques. Il faut aussi rappeler que les incubations ont été réalisées dans des conditions réductrices favorisant la transformation d'androstènedione en testostérone.



Au cours de la troisième expérience, réalisée avec de la testostérone et de l'androstènedione marquées, nous avons vu qu'après 30 minutes d'incubation 8 % de la testostérone sont transformés en androstènedione alors que 19,8 % de l'androstènedione sont convertis pendant le même temps. Le rapport androstènedione/testostérone de 0,40 montre que le système enzymatique mis en jeu favorise la réduction ainsi qu'on peut s'y attendre en présence de NADPH. Cependant, après 20 minutes d'incubation, 19,4 % de la testostérone sont convertis de même que 20,7 % de l'androstènedione. Le rapport androstènedione/testostérone est alors voisin de 1 (0,94). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que probablement une certaine quantité de NADPH est progressivement oxydée en  $\text{NADP}^+$ , qui à son tour catalyse les phénomènes d'oxydation. La formation de composés hydroxylés en 6, 16 ou 20 a aussi pour conséquence de fournir plus de  $\text{NADP}^+$  et de fait ce mécanisme est très plausible par suite de la mise en évidence de composés très polaires sur les premiers chromatogrammes. De plus, SHARMA (139) a montré que des homogénats de testicule de rats peuvent transformer la testostérone en androstènedione et inversement, même sans addition de co-facteur. Enfin, les expériences de mesure de la consommation de NADPH exogène ont montré la transformation presque complète au bout de 120 minutes de NADPH en  $\text{NADP}^+$  favorisant d'autant plus la transformation de testostérone en androstènedione.



En passant en revue tous ces résultats dont certains peuvent sembler contradictoires ou difficiles à interpréter du fait de l'intrication de plusieurs facteurs agissant dans le même sens ou en sens opposé, il nous paraît impossible à l'heure actuelle d'affirmer l'existence certaine d'une voie courte reliant la progestérone à la testostérone, mais il n'en reste pas moins qu'un certain nombre d'arguments tirés des expériences des auteurs précédemment cités et des nôtres plaident en sa faveur. De nouvelles recherches sont actuellement en cours pour essayer de corroborer nos résultats (36).

Il faut également mentionner des voies métaboliques qui tendent à éliminer l'hormone testiculaire soit en réduisant sa double liaison sous l'effet d'une réductase, soit en hydroxylant sa molécule. En effet, nous avons identifié l'épiandrosterone et pressenti à son côté des isomères de polarité voisine. En outre, on retrouve une part importante de la radioactivité au niveau de composés plus polaires que le cortisol dont l'identification est actuellement en cours.

Nous n'avons pas mentionné d'autres expériences au cours desquelles nous avons mesuré le taux du cholestérol de la fraction mitochondriale et qui ne nous ont pas permis de mettre en évidence des variations de celui-ci au cours de la biogénèse et du métabolisme de la testostérone.





## II

### LA TESTOSTERONE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES



## II - LA TESTOSTERONE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

---

### A) HISTORIQUE

#### 1°) Dosage de la testostérone plasmatique

La première technique de détermination de la testostérone dans le sang de la veine spermatique humaine a été décrite par HOLLANDER et HOLLANDER en 1958 (76). Cette méthode comporte l'addition de testostérone- $^{14}\text{C}$  au plasma pour faciliter l'identification et permettre le calcul de la récupération, une extraction par l'éther, puis un partage entre l'éther de pétrole et l'éthanol à 70 % après traitement de la fraction alcoolique par la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH); le dérivé est chromatographié sur deux colonnes d'alumine différentes. La quantité de testostérone présente dans l'échantillon est calculée d'après l'activité spécifique de la dinitrophénylhydrazone obtenue après la deuxième chromatographie. Cette méthode a été très peu utilisée.

Elle a été rapidement remplacée par la méthode de FINKELSTEIN, FORCHIELLI et DORFMAN (49, 54) qui est encore



actuellement couramment utilisée dans de nombreux laboratoires. Dans cette méthode, 50 ml de plasma auxquels on ajoute une dose traceuse de testostérone-4-<sup>14</sup>C sont extraits par l'éther-chloroforme; puis, après précipitation des protéines, on procède à une chromatographie dans le système ligroïne/propylène-glycol, parallèlement à un standard. La zone contenant la testostérone est déterminée par absorption à 240 mμ. L'éluat de cette zone est soumis à l'action des microsomes placentaires qui transforment la testostérone en oestrogène (oestrone et oestradiol-17β). On traite ensuite l'extrait par le borohydrure de sodium pour réduire l'oestrone présente en oestradiol-17β. Après chromatographie dans le système benzène-méthanol (98:2), la détermination est effectuée par fluorométrie selon la méthode de FINKELSTEIN (48). Avec cette méthode, le taux de la testostérone plasmatique chez l'homme varie entre 0,1 et 0,98 μg par 100 ml de plasma avec une valeur moyenne de 0,56 μg. Chez la femme, les taux s'échelonnent entre 0,02 et 0,26 μg par 100 ml de plasma avec une moyenne de 0,12.

En 1960, OERTEL (116) a décrit une méthode chimique de dosage de la testostérone par une micromodification de la réaction colorimétrique de KOENIG (92) après purification de cette hormone par chromatographie sur papier et sur colonne. Cette technique ayant été très peu employée, nous n'y insisterons pas.



La méthode de HUDSON et al. (77) apparaît comme beaucoup plus intéressante. Elle est basée sur le principe de la double dilution isotopique. Après addition d'une dose traceuse de testostérone-4-<sup>14</sup>C au plasma, on procède à une extraction par le dichlorométhane. L'extrait est ensuite acétylé par de l'anhydride acétique tritié. L'acétate de testostérone doublement marqué est alors purifié par chromatographie sur papier dans trois systèmes différents. Puis par action de la thiosemicarbazide, on forme la thiosemicarbazone d'acétate de testostérone qui est elle-même purifiée par chromatographie sur papier dans deux systèmes différents. Cette méthode dont la sensibilité est de l'ordre de 0,05 µg par 100 ml de plasma donne les résultats suivants : chez l'homme, la moyenne est de l'ordre de 0,74 µg alors que chez la femme elle est de l'ordre de 0,11 µg par 100 ml de plasma.

Parallèlement, à la même époque, RIONDEL et al. (121) publiaient une autre méthode de double dilution isotopique. Dans cette méthode, la thiosemicarbazide-<sup>35</sup>S est utilisée comme réactif et la testostérone-1,2-<sup>3</sup>H comme traceur. La purification est réalisée à l'aide de deux chromatographies en couche mince et une chromatographie sur papier de la thiosemicarbazone de testostérone suivie d'une chromatographie sur couche mince et d'une chromatographie sur papier de la 2,4-diacétyl-thiosemi-





carbazone de testostérone. Cette technique est d'une grande sensibilité ( $13 \text{ ng} \pm 2$ ). Les valeurs obtenues chez l'homme sont de  $0,8 \pm 0,25$  et chez la femme de  $0,059$  à  $0,079 \text{ } \mu\text{g}$  par  $100 \text{ ml}$  de plasma. La difficulté de cette technique réside dans le fait que d'une part, elle est extrêmement longue et laborieuse et nécessite un personnel très entraîné et d'autre part, que les récupérations sont très faibles de l'ordre de  $5 \%$  et obligent de ce fait à compter en scintillation liquide pendant des temps très longs. BURGER et al. (17) puis LIM et al. (99) ont publié des modifications de ces techniques de double marquage les rendant d'application plus simple en physiopathologie.

La méthode de BROWNIE et al. (16) a ouvert des horizons nouveaux sur le dosage de la testostérone plasmatique. En effet, cette technique met en jeu la détermination de la testostérone par chromatographie en phase gazeuse avec détection par capture d'électrons. Après addition de testostérone- $1,2\text{-}^3\text{H}$  en quantité traceuse à  $2 \text{ ml}$  de plasma hépariné, la testostérone est extraite et l'extrait chromatographié en couche mince dans le système acétate d'éthyle-cyclohexane ( $1:1$ , v/v). La zone contenant la testostérone est éluée et l'on prépare le dérivé monochloro-acétique. Celui-ci est purifié par chromatographie en couche mince dans le système benzène-acétate d'éthyle ( $4:1$ , v/v). Après élution, on ajoute une faible quantité de monochloroacétate de



cholestérol qui servira de standard interne, (actuellement, les auteurs préfèrent ajouter du monochloroacétate de 20 $\beta$ -dihydro-progestérone qui donne de meilleurs résultats). Le dosage est effectué par chromatographie gazeuse avec un appareil muni d'un détecteur à capture d'électrons alimenté par un courant pulsé de 50 volts. La phase stationnaire utilisée est de la cyano-éthylméthylsilicone (GE XE 60) à 1 %. Cette méthode permet la détection de 1 ng de dérivé. La précision est de l'ordre de 2 ng à 5 ng, fonction de la quantité absolue de stéroïde mesurée.

La moyenne des valeurs obtenues chez l'homme est de 0,5  $\mu$ g et chez la femme de 0,05  $\mu$ g par 100 ml de plasma. Cette méthode relativement simple et très précise nécessite cependant un personnel entraîné dans le maniement de la chromatographie en phase gazeuse.

Nous ne ferons que citer la méthode de GUERRA-GARCIA et al. (63) qui comporte une extraction du plasma par l'éther suivie d'une chromatographie en couche mince sur silicagel et enfin d'une chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme qui permet de faire une séparation finale et une mesure de la testostérone. La sensibilité du détecteur en limite l'utilisation et on ne peut pas descendre au-dessous de 1  $\mu$ g par 100 ml de plasma.



KIRSCHNER et al. (90) et surtout KLIMAN (91) ont publié des méthodes particulièrement intéressantes qui sont un compromis entre les techniques précédentes. Après addition au plasma d'une dose traceuse de testostérone-4- $^{14}\text{C}$ , on procède à une acétylation avec de l'anhydride acétique-1- $^3\text{H}$  de haute activité spécifique. L'acétate de testostérone est purifié par chromatographie sur couche mince et éventuellement sur papier, puis chromatographié en phase gazeuse après addition d'acétate de testostérone froid. Le pic correspondant est collecté et la mesure dans un scintillateur des radioactivités en  $^3\text{H}$  et en  $^{14}\text{C}$  et du rapport de celles-ci permet de calculer le taux plasmatique de la testostérone.

En conclusion, la méthode de FINKELSTEIN peut être considérée comme une méthode d'intérêt historique et on a le choix actuellement entre trois catégories de techniques pour le dosage de la testostérone plasmatique :

1. La méthode de double dilution isotopique
2. La méthode de chromatographie gazeuse avec capture d'électrons
3. Les méthodes associant la chromatographie gazeuse et le double marquage de la molécule de testostérone.



## 2°) Dosage de la testostérone urinaire

De l'étude des méthodes proposées pour la détermination de la testostérone plasmatique, il est aisé de se rendre compte de la difficulté de leur application pratique. C'est pour cette raison que nombre d'auteurs se sont tournés vers l'investigation de méthodes permettant la détermination de la testostérone dans l'urine. Le point de départ de ces recherches a été l'isolement en 1960 par SCHUBERT et WEHRBERGER (137) de testostérone à partir d'un large pool d'urines d'hommes adultes après hydrolyse par la  $\beta$ -glucuronidase. Par ailleurs, FISHMAN et SIE (50) avaient précédemment montré la glucuroconjugaison de la testostérone après incubation de ce stéroïde avec des tranches de foie et EDWARDS et KELLIE (41) avaient suggéré la présence de glucuronide de testostérone dans les urines humaines après administration de doses importantes de propionate de testostérone.

La première méthode de dosage de la testostérone urinaire a été décrite par CAMACHO et MIGEON (22) en 1963. Cette méthode comporte les étapes suivantes : tout d'abord une hydrolyse par la  $\beta$ -glucuronidase, puis une extraction par l'éther; l'extrait est alors chromatographié sur une colonne de florisil, puis sur une colonne d'alumine avec élution par gradient. Cette chromatographie sur colonne est suivie de deux chromatographies sur





papier dans des systèmes différents. La testostérone est enfin dosée par spectrophotométrie en présence d'acide sulfurique à 299 mμ. Selon cette méthode, chez l'homme adulte les taux varient entre 46 et 106 μg et chez la femme adulte, l'excrétion a été trouvée inférieure à 8 μg par nycthémère. ZURBRUGG et al. (163) ont publié récemment une modification de cette technique utilisant uniquement la chromatographie sur colonne d'abord sur florisil puis sur alumine, le dosage étant effectué par la réaction d'ALLEN (3) améliorée par les auteurs.

Quelques mois plus tard, FUTTERWEIT (56) publiait une méthode de dosage de la testostérone urinaire par chromatographie en phase gazeuse, méthode à la réalisation de laquelle nous avons collaboré et qui sera décrite plus loin en détail.

En 1964, IBAYASHI et al. (78) publient une technique basée sur le même principe que celle que nous avons réalisée et qui n'en diffère que par une acétylation précédant la chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode qui utilise le même système de détection, c'est-à-dire un détecteur à ionisation de flamme permet de doser jusqu'à 5 μg de testostérone par 24 heures. Les valeurs obtenues par cette méthode sont chez l'homme adulte comprises entre 41 et 200 μg par jour alors que chez la femme normale, les taux sont inférieurs à 5 μg, limite de sensibilité de cette technique.



Ces deux dernières méthodes ont l'inconvénient de ne pas permettre la séparation de la testostérone de l'épitestostérone stéroïde qui, comme on l'a montré récemment, est présent dans les urines en grande quantité.

C'est pour cette raison que BROOKS (12) a publié en 1964 une technique permettant de séparer et de doser la testostérone et l'épitestostérone dans l'urine. Sa méthode est un compromis entre celle de FUTTERWEIT et celle de IBAYASHI. Les urines sont hydrolysées par la  $\beta$ -glucuronidase et les stéroïdes neutres extraits par l'éther. On réalise ensuite une séparation des stéroïdes cétoniques par le réactif T de Girard, puis une purification par chromatographie en couche mince. La testostérone est alors séparée de l'épitestostérone par chromatographie sur papier dans le système ligroïne/propylèneglycol. Chacun de ces stéroïdes est alors acétylé et dosé par chromatographie gaz-liquide à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme. Le taux de la testostérone chez l'homme varie entre 33 et 120  $\mu\text{g}$  alors que chez la femme, il varie entre 7 et 18  $\mu\text{g}$  par jour. Celui de l'épitestostérone chez l'homme varie entre 27 et 334  $\mu\text{g}$ , alors que chez la femme, il oscille entre 27 à 53  $\mu\text{g}$  par 24 h. Si les données sur le taux de l'épitestostérone sont encore très fragmentaires du fait du petit nombre de dosages réalisés à ce jour, il apparaît cependant que les taux avancés par BROOKS (12) sont



largement supérieurs à ceux publiés par d'autres auteurs et ne dépassent que rarement 50  $\mu\text{g}$  par jour chez l'homme.

En 1963, VERMEULEN et VERPLANCKE (158) publient une technique de dosage de la testostérone urinaire dont la particularité est l'oxydation par l'acide chromique de la testostérone en androstènedione qui est ensuite dosée par une micro-réaction de Zimmerman. Par cette méthode, le taux de la testostérone urinaire chez l'homme est en moyenne de 40  $\mu\text{g}$  alors que chez la femme il varie entre 5 et 12  $\mu\text{g}$  par 24 heures. L'inconvénient de cette technique est qu'elle est peu sensible et nécessite l'extraction de grande quantité d'urine, en règle de la moitié des urines de 24 heures.

La technique de ROSNER et al. (124) est fort peu différente de la précédente et n'en diffère que par le remplacement des chromatographies en couche mince par des chromatographies sur papier dans trois systèmes différents. Les valeurs publiées par ces auteurs pour le glucuronide de testostérone sont chez la femme normale de  $19 \pm 3$   $\mu\text{g}$  par 24 heures, et chez l'homme normal, la moyenne varie entre 88 et 151  $\mu\text{g}$  en fonction de l'âge. Les valeurs obtenues chez la femme nous paraissent très élevées et ne correspondent pas à celles publiées par la plupart des autres auteurs. VOIGT et al. (160) ont publié récemment une technique qui comporte trois étapes de chromatographie diffé-



rentes, la première sur florisil, la seconde sur silicagel G en couche mince et la troisième sur papier dans le système Bush B3. La testostérone est dosée sous forme de l'hydrazide de l'acide isonicotinique. L'excrétion moyenne chez l'homme est par cette technique de 50  $\mu$ g alors qu'elle est chez la femme normale de 10  $\mu$ g par 24 heures. Ces auteurs signalent que leur technique ne sépare probablement pas la testostérone de l'épitestostérone, mais ils ne le démontrent pas. Les taux qu'ils trouvent sont relativement faibles.

Il nous faut encore mentionner les importants travaux de KORENMAN et LIPSETT (93, 94) sur le taux de la testostérone urinaire et ceux de LIM et DINGMAN (100) qui ont publié récemment une méthode similaire utilisant la chromatographie sur fibre de verre.

En résumé, comme pour le dosage de la testostérone plasmatique, deux types de méthodes sont employés, d'une part celles qui mettent en jeu un dosage colorimétrique et nécessitent de nombreuses purifications préalables et d'autre part, celles qui se terminent par un dosage par chromatographie en phase gazeuse et qui ont l'avantage d'ajouter à la sensibilité de la détection le pouvoir résolutif supérieur de ce type de chromatographie







## B) CONTRIBUTION PERSONNELLE

### 1°) Dosage de la testostérone urinaire par chromatographie en phase gazeuse

Il nous faut maintenant décrire en détail la technique à la mise au point de laquelle nous avons travaillé en collaboration avec W. FUTTERWEIT sous la direction du Docteur DORFMAN (56-58).

#### a) Matériel

- $\beta$ -glucuronidase de foie de boeuf (Ketodase) titrant 4.000 unités Fishman par ml (Warner Chilcott, Morris Plains, N.J.

- Silicagel G : ces chromatoplaques sont préparées en mélangeant 30 g. de silicagel G avec 60 ml d'eau que l'on homogénéise par agitation dans un erlenmeyer. Les chromatoplaques sont activées à 100° C pendant 60 minutes et conservées en desiccateur sur Actigel.

- Stéroïdes purs : la pureté de tous les stéroïdes a été vérifiée par spectrophotométrie à l'aide d'un appareil BECKMAN IR 7.

- Solution scintillante : cette solution a été préparée comme indiqué précédemment.



- Réactif T de Girard (General Biochemicals, Chalgrin Falls, Ohio).

- Testostérone-1,2-<sup>3</sup>H : la testostérone tritiée a été synthétisée par le Docteur Marcel GUT de la Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, Mass. en employant la méthode de OSINSKI-VANDERHAEGUE (117) pour la tritiation de stéroïdes de haute activité spécifique. La testostérone obtenue avait une activité spécifique de 153  $\mu\text{C}/\mu\text{g}$  et a été purifiée par chromatographie sur papier dans le système Bush B3. Cette testostérone radioactive a été conservée à la glacière en solution dans du benzène à 10 % de méthanol.

- Appareillage : pour le dosage, nous nous sommes servis d'un appareil Research Specialties Co., modèle 600, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, modèle 660-1B. L'enregistreur était du type Sargent, modèle SR, donnant une déflexion maximum pour un millivolt avec un déroulement du papier de 2,5 cm par minute. L'introduction des échantillons est réalisée par l'intermédiaire d'un injecteur solide dont le modèle a été réalisé par Mc NIVEN (112). L'échantillon liquide est déposé sur l'extrémité de l'injecteur solide (platine ou argent) et l'injecteur placé dans une étuve à 60°C jusqu'à évaporation du solvant; puis l'injecteur est introduit dans la chambre de vaporisation et laissé en place pendant 45 secondes. L'étanchéité de cette chambre est réalisée par une valve en téflon.



Le recueil du matériel effluent a été effectué en utilisant un autre appareil de la même marque, modèle 600, équipé d'un détecteur à ionisation d'argon, modèle B600. La testostérone a été collectée à la température du laboratoire dans un capillaire de verre ou de téflon branché sur la sortie de la colonne. Après lavage du tube par le dichlorométhane, le stéroïde élué a été analysé par spectrographie infrarouge. La surface des pics a été mesurée en employant un planimètre de type Royson, modèle 210, enregistrant 1.200 comptes pour 2,5 cm de déflexion maximum.

#### b) Méthode

- Hydrolyse : 100 ml d'urine sont amenés à pH 5,0 avec de l'acide sulfurique à 50 %; puis on ajoute 5 ml de tampon acéto-acétique 0,1 M, pH 5,0, 4 ml de chloroforme, 12 ml de Ketodase et la testostérone-1,2-<sup>3</sup>H (0,00412 µg). L'hydrolyse est réalisée à 37° C pendant 96 heures.

- Extraction : l'extraction est réalisée par deux fois 100 ml et une fois 50 ml d'éther anhydre. Les fractions étherées sont ensuite réunies puis lavées 3 fois par 15 ml de NaOH 2N et enfin par 7,5 ml d'eau. L'extrait étheré est ensuite évaporé à sec sous azote à 40° C.



- Séparation des stéroïdes cétoniques par le réactif T de Girard : à l'extrait sec, on ajoute 100 mg de réactif T de Girard et 0,5 ml d'acide acétique glacial. On chauffe le mélange dans un bain d'eau bouillante pendant 20 minutes puis on refroidit dans de l'eau glacée. On verse 3 ml de NaOH à 10 % conservée à la glacière, dans une ampoule à décantation préalablement refroidie et on y ajoute le mélange en le transférant à l'aide de 3 lavages par 5 ml d'eau distillée refroidie. Après agitation vigoureuse, la solution aqueuse est lavée 3 fois par 15 ml d'éther refroidi et les fractions étherées combinées, relavées par 10 ml d'eau. Toutes les fractions aqueuses sont alors combinées, amenées à pH 1 avec de l'acide chlorhydrique concentré et laissées à la température du laboratoire pendant 2 à 3 heures. La fraction cétonique hydrolysée est alors extraite par 4 fois le même volume d'éther. La fraction étherée est lavée une fois avec 10 ml de carbonate de sodium à 2,5 % et 3 fois avec 10 ml d'eau distillée. On évapore la fraction étherée à sec et le résidu est dissous dans une petite quantité de mélange méthanol-dichlorométhane (1:1, v/v).

- Chromatographie en couche mince : l'extrait urinaire de même que la testostérone standard sont appliqués sur une chromatoplaque de silicagel de 20 x 20 cm. La chromatographie est développée selon le mode ascendant par le mélange benzène-





acétate d'éthyle (3:2). Après 70 à 100 minutes, le front s'étant déplacé de 15 à 17 cm, on retire la chromatoplaque. Les taches de testostérone standard sont localisées sous lumière ultraviolette (245 mμ) et la zone correspondante de l'extrait urinaire, après grattage avec une lame de rasoir, est éluée par l'acétate d'éthyle ou l'acétone. L'éluat est amené à sec sous azote et on prélève un aliquote de 10 % pour détermination de la radioactivité en scintillation liquide. On transfère alors le reste de l'extrait urinaire dans un petit tube conique, on l'amène à sec et on le place au réfrigérateur jusqu'à l'étape de la chromatographie gazeuse.

- Chromatographie en phase gazeuse : nous avons habituellement utilisé une colonne d'acier inoxydable de 90 cm de long, de 1,9 mm de diamètre et comme support de l'ANAKROM ABS (110-120 mesh) recouvert de la phase stationnaire SE 30 (General Electric Co.) à 6,8 %. Le revêtement du support est réalisé par la technique de filtration (157). La colonne de métal et la lame de verre sont "silanisées" par trempage pendant 24 heures dans une solution de dichlorodiméthylsilane à 5 % dans le toluène avant le remplissage de la colonne. Ce remplissage est réalisé par aspiration avec vibration de la colonne étant donné qu'il n'est pas possible d'introduire le support sous pression dans des colonnes d'aussi faible diamètre. Puis, la colonne est



conditionnée pendant une nuit à 275° C sous faible débit d'azote. Chaque colonne est testée à l'aide du mélange cholestérol-cholestane et le nombre de plateaux théoriques pour le cholestane calculé selon la formule  $N = 16x^2/l^2$ , N étant le nombre de plateaux théoriques, x la largeur de la base du pic du cholestane et l, le temps de rétention du cholestane. Une colonne pour être considérée comme valable, doit d'une part avoir 2.000 à 3.000 plateaux théoriques pour le cholestane et d'autre part donner un pic symétrique pour le cholestérol.

Les conditions employées pour le dosage de la testostérone urinaire ont été les suivantes :

- température de la colonne : 240° C
- température de la chambre d'injection : 330° C
- pression à l'entrée de la colonne :  $47 \times 0,0703 \text{ Kg/cm}^2$ .

On dissout le résidu sec dans 200 à 500 microlitres et on le mélange pendant 20 à 30 secondes à l'aide d'un vibreur Vortex Junior. On transfère alors un aliquote de 5 à 25 µl à l'aide d'une seringue Hamilton sur la pointe de l'injecteur solide; après évaporation du solvant, l'injecteur est introduit dans la chambre d'injection.

- Dosage de la testostérone urinaire : on injecte d'abord des quantités croissantes de testostérone standard et on établit



une courbe, en portant en abscisse la quantité de stéroïde injectée et en ordonnée, soit la hauteur du pic s'il est fin et symétrique, soit l'aire de ce pic. Cette courbe doit être reproduite tous les jours, étant donné que la réponse du détecteur est éminemment variable avec les différents paramètres : température de la colonne, débit du gaz vecteur, intensité de la flamme d'hydrogène. Puis, on injecte à deux reprises un aliquote de l'extrait urinaire, chaque injection étant séparée par une injection d'acétone, de façon à être certain que la vaporisation de l'échantillon a été complète (fig. 25). On reporte la valeur obtenue sur la courbe et on calcule la quantité de testostérone contenue dans l'échantillon. La quantité totale de testostérone présente dans les urines de 24 heures est calculée en tenant compte des pertes subies pendant l'extraction et la chromatographie en couche mince, pertes qui sont appréciées par le calcul de la radioactivité résiduelle du traceur isotopique.

### c) Résultats

#### - Spécificité de la méthode

Dans le Tableau XVIII, nous avons reproduit les temps de rétention relatifs au cholestane de la plupart des stéroïdes pouvant interférer avec la testostérone en utilisant le SE 30 comme



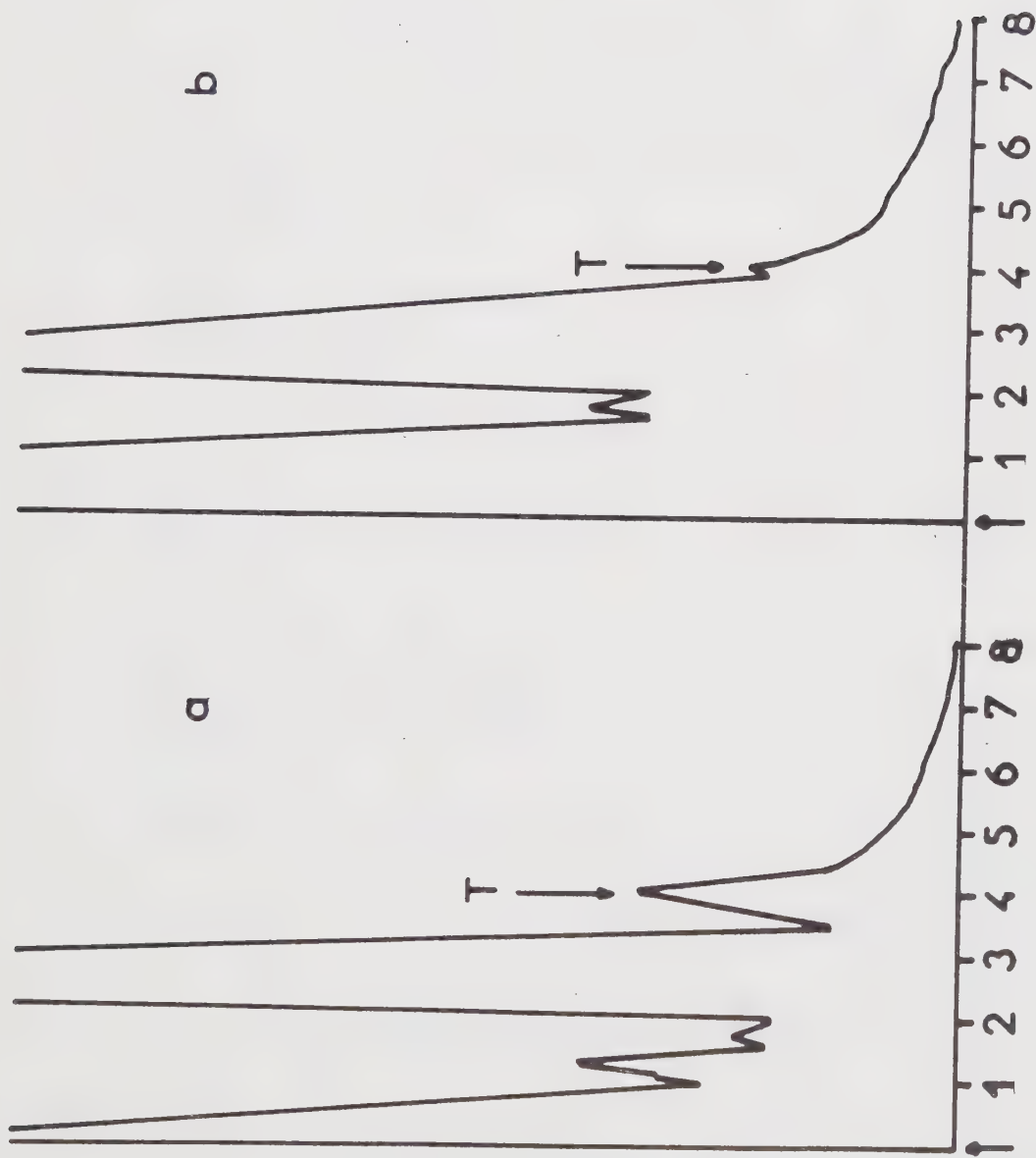


Fig. 25

Chromatogramme de deux extraits urinaires :

a) homme de 29 ans : 348  $\mu\text{g}/24$  heures

b) femme de 53 ans : 4  $\mu\text{g}/24$  heures.





TABLEAU .XVIII. .

| STEROIDE                                          | T.R.R. |
|---------------------------------------------------|--------|
| Cholestane                                        | 1,00 ° |
| Etiocholanolone                                   | 0,43   |
| Androstérone                                      | 0,44   |
| Déhydroépiandrostérone                            | 0,45   |
| 5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione                 | 0,48   |
| Trifluoro acétate de testostérone                 | 0,50   |
| Acétate d'étiocholanolone                         | 0,55   |
| Acétate d'androstérone                            | 0,56   |
| Androsta-4-ène-3,17-dione                         | 0,56   |
| Testostérone                                      | 0,57   |
| Testostérone triméthyl-silyl-éther                | 0,72   |
| 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol | 0,73   |
| Acétate de testostérone                           | 0,87   |
| Progestérone                                      | 0,91   |
| 20 $\alpha$ -hydroxy-pregna-4-ène-3-one           | 1,08   |
| 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone                  | 1,34   |

° (T.R. cholestane : 7,5 mn.)

TEMPS DE RETENTION RELATIF AU CHOLESTANE



phase stationnaire. Ce tableau nous montre que l'androstènedione n'est pas séparée de la testostérone en utilisant cette phase stationnaire. Cependant, cette séparation est réalisée auparavant par chromatographie en couche mince ainsi que le montre le Tableau XIX. En effet, en utilisant le système benzène-acétate d'éthyle (3:2), la testostérone a un Rf de 0,47, alors que l'androstènedione a un Rf de 0,69. Ainsi, si la migration est rigoureusement horizontale, ces deux composés peuvent être facilement séparés sur chromatoplaque. Cependant, la séparation de la déhydroépiandrostérone dont le Rf dans ce système est de 0,67 présente beaucoup plus de difficultés. En effet, ce stéroïde est présent dans les urines à une concentration dix fois supérieure à celle de la testostérone et donne une tache très importante sur la chromatoplaque tendant à empiéter plus ou moins sur la zone de la testostérone. Heureusement, le temps de rétention de la déhydroépiandrostérone (T.R.R. 0,45) est plus court que celui de la testostérone (T.R.R. 0,57). Ainsi, en prenant deux précautions, la première étant de gratter une zone assez étroite, la deuxième étant de trouver un temps de rétention pour la testostérone voisin de 10 à 12 minutes, on peut espérer avoir un pic assez net pour la testostérone, sans contamination majeure par la déhydroépiandrostérone.



TABLEAU .XIX.

| STEROIDE                                | Rf    |
|-----------------------------------------|-------|
| Cortisol                                | 0,074 |
| 11-cétoétiocholanolone                  | 0,22  |
| Testostérone                            | 0,47  |
| 20 $\alpha$ -hydroxy-pregna-4-ène-3-one | 0,53  |
| Etiocholanolone                         | 0,54  |
| 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone        | 0,55  |
| Androstérone                            | 0,60  |
| Prégnénolone                            | 0,64  |
| Déhydroépiandrostérone                  | 0,67  |
| Androsta-4-ène-3,17-dione               | 0,69  |
| Progestérone                            | 0,77  |
| Acétate de testostérone                 | 0,85  |

SEPARATION DES STEROIDES SUR SILICAGEL G

(système benzène/acétate d'éthyle, 3:2)



- Fidélité

Les résultats de 8 dosages en double réalisés à partir du même extrait sont présentés sur le Tableau XX, l'erreur étant de  $\pm 7 \%$  ( $P = 0,99$ ). Signalons que pour avoir des résultats reproductibles, il faut d'une part opérer toujours avec la même seringue et d'autre part tenir compte de la quantité de solution présente dans l'aiguille.

- Sensibilité

Bien que le détecteur à ionisation de flamme de l'appareil que nous avons utilisé nous ait permis de doser  $0,01 \mu\text{g}$  de testostérone pure, il n'est pas possible de doser de telles quantités à partir d'extraits urinaires. En effet, les fluctuations du bruit de fond sont alors plus importantes et par définition un pic n'est interprétable que si sa hauteur est au moins deux fois supérieure aux fluctuations de ce bruit de fond. Dans ces conditions, la limite ultime de sensibilité de mesure de la testostérone par cette méthode s'est révélée être de l'ordre de 10 à  $15 \mu\text{g}$  dans la totalité des urines de 24 heures.

- Récupération

$200 \mu\text{g}$  de glucuronide de testostérone ont été ajoutés à 4 aliquotes de 100 ml d'urine de femme adulte et dans ce cas, les





TABLEAU .XX.

| INJECTION N° | UNITES D'INTEGRATION | TESTOSTERONE $\mu\text{g}/\text{l}$ |
|--------------|----------------------|-------------------------------------|
| 1            | 164                  | 112                                 |
| 2            | 164                  | 112                                 |
| 3            | 166                  | 113                                 |
| 4            | 164                  | 112                                 |
| 5            | 170                  | 115                                 |
| 6            | 168                  | 114                                 |
| 7            | 146                  | 100                                 |
| 8            | 145                  | 99                                  |
|              |                      | $109 \pm 7,8 \mu\text{g}/\text{l}$  |
|              |                      | $(\pm 7,0 \%)$                      |
|              |                      | $n = 8p = 0,99$                     |

RESULTATS D'INJECTIONS REPETEES DE 10  $\mu\text{l}$   
D'UN EXTRAIT D'URINE D'HOMME ADULTE.



récupérations ont été de 67, 89, 76 et 98 %. Cependant, si l'on se base sur la récupération de la testostérone radioactive, on obtient des résultats un peu différents; la récupération est en moyenne de 80 % après extraction par l'éther en ampoule à décantation (nous n'avons obtenu qu'une récupération de 70 % en extrayant la testostérone par le dichlorométhane sur tapis roulant). La récupération après séparation par le réactif T de Girard est en moyenne de 50 % et enfin la récupération de la testostérone après chromatographie en couche mince est de 80 à 90 %, ce qui fait qu'au total la récupération est d'environ 40 %. Afin de l'améliorer, nous nous sommes attachés surtout à perfectionner l'étape dont la récupération est la plus faible, c'est-à-dire la séparation par le réactif T de Girard. En pratiquant la précipitation par le réactif de Girard à froid, nous avons pu augmenter la récupération de cette étape d'environ 30 à 40 %. Selon cette modification, on verse dans un tube contenant le résidu urinaire, 1 ml d'alcool méthylique à 80 %, 1 ml d'acide acétique glacial et un poids de réactif T de Girard environ deux fois supérieur à celui de l'extrait urinaire; on chauffe légèrement le mélange jusqu'à dissolution et on laisse reposer pendant une nuit. Le reste de la procédure est identique à celle que nous avons indiquée précédemment. En appliquant cette modification, la récupération totale devient égale en moyenne à 58 %.



- Taux de la testostérone urinaire chez les sujets normaux et pathologiques

La testostérone urinaire a été mesurée chez 36 hommes de 19 à 35 ans. En règle, il semble y avoir une plus grande excrétion de testostérone chez l'homme de moins de 30 ans comme le montre le Tableau XXI. La modification de la méthode que nous venons de rapporter nous a permis de doser avec une assez grande précision la testostérone urinaire chez 10 femmes âgées de 23 à 37 ans et dont les taux sont représentés sur le Tableau XXII. Les valeurs obtenues oscillent entre 2,4 et 8  $\mu\text{g}$  par jour avec une moyenne de 6  $\mu\text{g}$ . Le fait remarquable est surtout l'énorme différence entre le taux de testostérone urinaire chez l'homme et chez la femme. Sur le Tableau XXIII, nous avons mentionné un certain nombre de résultats que nous avons obtenus chez des malades atteints d'affections endocriniennes. L'hyperplasie surrénale congénitale s'accompagne d'une élévation marquée de l'excrétion de la testostérone (dans un cas, nous avons trouvé 709  $\mu\text{g}$  de glucuronide de testostérone dans les urines). Un cas de syndrome de Stein-Leventhal a pu être étudié et la testostérone y était particulièrement augmentée (68  $\mu\text{g}$ ). Enfin, dans un cas d'hirsutisme idiopathique, nous avons retrouvé une élévation importante de la testostérone.



TABLEAU .XXI.

| AGE | n | TESTOSTERONE $\mu\text{g}/\text{JOUR}$ |
|-----|---|----------------------------------------|
| 19  | 2 | 291 (250-332)                          |
| 20  | 1 | 82                                     |
| 21  | 1 | 176                                    |
| 22  | 2 | 154 (134-174)                          |
| 23  | 1 | 275                                    |
| 27  | 2 | 77 (65-89)                             |
| 28  | 1 | 129                                    |
| 30  | 1 | 92                                     |
| 31  | 2 | 98 (45-150)                            |
| 32  | 1 | 90                                     |
| 33  | 1 | 64                                     |
| 34  | 1 | 69                                     |
| 35  | 2 | 84 (83-84)                             |
| 42  | 2 | 38 (28-51)                             |
| 44  | 3 | 88 (29-159)                            |
| 45  | 3 | 91 (66-138)                            |
| 46  | 1 | 146                                    |
| 47  | 3 | 75 (51-118)                            |
| 48  | 2 | 72 (39-104)                            |
| 49  | 3 | 80 (25-155)                            |
| 55  | 1 | 88                                     |

TESTOSTERONE DANS L'URINE D'HOMMES NORMAUX.





TABLEAU .XXII.

| AGE | n | TESTOSTERONE $\mu\text{g}/\text{JOUR}$ |
|-----|---|----------------------------------------|
| 23  | 3 | 4,7 (2,4-7)                            |
| 24  | 2 | 8 (8 - 8)                              |
| 25  | 1 | 5,2                                    |
| 33  | 1 | 2,8                                    |
| 36  | 1 | 8                                      |
| 37  | 2 | 8 (8 - 8)                              |

TESTOSTERONE DANS L'URINE DE FEMMES NORMALES.



TABLEAU .XXIII.

| DIAGNOSTIC                  | AGE (SEXE)            | TESTOSTERONE $\mu\text{g}/\text{JOUR}$ |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------------------------|
|                             | 50 (M)                | 115                                    |
| Hyperplasie congénitale     | 49 (F)                | 709                                    |
| surrénalienne               | 30 (F)                | 25                                     |
|                             | 6 jours (F)           | 87                                     |
|                             | 3 jours (F)           | 100                                    |
| Syndrome de Stein-Leventhal |                       |                                        |
| (hirsutisme)                | 25 (F)                | 68                                     |
| Orchidie                    | 19 (M)                | 4,2                                    |
|                             | 25 (F)                | 28                                     |
|                             | 25 (F)                | 25                                     |
| Hirsutisme idiopathique     | 28 (F)                | 47                                     |
|                             | 30 (F)                | 28                                     |
| Syndrome de Cushing et      | 28 (F)                | 390                                    |
| irilisme                    | (adénome surrénalien) |                                        |
| Tumeur masculinisante sur-  |                       |                                        |
| surrénalienne (maligne)     | 42 (F)                | 1200-1400                              |
|                             |                       | (post-opératoire 4-5,7)                |

TESTOSTERONE DANS L'URINE  
DE MALADES ATTEINTS D'AFFECTIONS ENDOCRINIENNES



d) Discussion

1. Discussion de la méthode

a. Hydrolyse : l'addition de 4 ml de chloroforme augmente selon VESTERGAARD l'activité de la  $\beta$ -glucuronidase (159). Cependant, il faut prendre soin lors de l'étape ultérieure de bien récupérer le chloroforme étant donné qu'il peut dissoudre une quantité non négligeable de testostérone radioactive. La période d'incubation peut être raccourcie et au bout de 48 heures, on obtient déjà une hydrolyse de l'ordre de 95 %.

b. Extraction : nous avons déjà parlé des avantages de l'extraction par l'éther qui nous a donné une meilleure récupération que celle de l'extraction par le dichlorométhane. Un autre point crucial mérite d'être discuté, c'est celui du lavage par la soude 2N; en effet, le contact prolongé entre NaOH concentrée et la testostérone-1,2- $^3\text{H}$  peut provoquer une énolisation de la testostérone et de ce fait une perte du tritium en position 2. Afin de vérifier s'il n'y avait pas de perte de radioactivité lors de la procédure d'extraction, nous avons comparé la récupération de testostérone- $^3\text{H}$  et de testostérone-4- $^{14}\text{C}$ . Dans le premier cas, nous avons obtenu une récupération de 91 % et dans le deuxième de 92 %. Ainsi, si le lavage par la soude est



effectué rapidement, on n'observe pas de pertes de radioactivité en employant de la testostérone-1,2-<sup>3</sup>H.

c. Séparation par le réactif T de Girard : nous avons déjà discuté de cette étape et montré l'intérêt d'opérer à froid plutôt qu'à chaud. Cependant, il n'en reste pas moins certain que cette réaction est de réalisation délicate et qu'entre des mains inexpérimentées, elle peut donner des taux de récupération faibles. Pour cette raison, il est possible d'omettre cette étape, et de la remplacer par une autre purification après la chromatographie en couche mince de la testostérone; celle-ci peut être la formation du triméthyl-silyl-éther ou de l'acétate de testostérone. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

d. Chromatographie en couche mince : dans la technique, telle qu'elle a été publiée, le support employé a été le silica-gel G. Il semble à l'heure actuelle préférable d'utiliser du silicagel GF 254 qui, grâce au produit fluorescent qu'il contient, permet d'utiliser des quantités de standard beaucoup moins grandes, de l'ordre de 0,5 à 1 µg. Le système benzène-acétate d'éthyle (3:2) s'est révélé être un des meilleurs parmi ceux que nous avons pu essayer mais d'autres mélanges peuvent être utilisés : acétone-cyclohexane (3:7), benzène-ligroïne-acétate d'éthyle (3:3:4), etc...





Le repérage et l'élution de la zone de la testostérone sont aussi deux points qui méritent d'être détaillés. On peut utiliser des chromatoplaques de 20 x 20 cm ce qui permet de délimiter 5 bandes de migration, les deux extérieures pour les standards et les trois centrales pour les extraits urinaires. Après la migration, on trace deux lignes horizontales englobant les deux standards et on élue entre ces deux lignes. Il est certain que dans un certain nombre de cas, la migration ne se fait pas de manière uniforme et peut être légèrement différente pour la testostérone contenue dans l'extrait urinaire. La présence d'une grande quantité de pigments peut ralentir la migration et de ce fait diminuer la récupération de la testostérone. Il est possible à ce stade d'augmenter cette récupération en déposant l'extrait urinaire sur une chromatoplaque de 5 x 20 cm et de localiser la zone radioactive; cela implique le dépôt d'une plus grande quantité de radioactivité, puisque le rendement du tritium à partir d'une chromatoplaque est de l'ordre de 0,5 %. Il est également nécessaire de disposer d'un grand nombre de plaques pour l'application pratique. Le mode d'élution nous a posé aussi bien des problèmes : le meilleur solvant est sans conteste le méthanol, mais il a pour inconvénient d'entraîner une certaine quantité de plâtre qui sert de liant dans le silicagel G, ce qui laisse un dépôt au fond du tube et favorise



l'adsorption de la testostérone sur ce dépôt. L'acétone qui donne une récupération légèrement plus faible de l'ordre de 80 % n'a pas cet inconvénient et c'est le solvant que nous avons retenu en général pour réaliser cette élution. L'acétate d'éthyle peut aussi être employé et en moyenne il permet d'éluer 75 % de la testostérone adsorbée sur le silicagel. Le mode d'élution que nous avons adopté consiste à utiliser un petit entonnoir que l'on bouche par un tampon de coton de verre préalablement lavé au méthanol. On dépose ensuite le silicagel correspondant à la zone à éluer et à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille fine on fait tomber goutte à goutte 10 ml d'acétone. Un certain nombre d'auteurs ont décrit des appareils permettant d'aspirer la zone à éluer et de pratiquer l'élution directement à l'aide de ces appareils. Cette technique qui a l'avantage de donner des récupérations de l'ordre de 90 à 95 % a l'inconvénient majeur de nécessiter de grandes quantités de solvant (50 à 100 ml). En effet, le solvant contient un grand nombre d'impuretés même après plusieurs distillations; ces impuretés peuvent interférer avec le dosage de la testostérone par chromatographie en phase gazeuse. L'acétylation de la testostérone que nous avons préconisée a l'avantage de permettre l'élution préalable de la testostérone par le méthanol. On peut ajouter quelques gouttes d'eau distillée afin de désactiver le silicagel ce qui permet



d'augmenter encore la récupération (16). On procède ensuite à la formation de triméthyl-silyl-éther ou d'acétate par les méthodes classiques (157). Dans le cas de la testostérone, l'acétylation nous a semblé être une procédure beaucoup plus intéressante du fait de la grande stabilité de l'acétate de testostérone comparée à l'hydrolyse extrêmement rapide du triméthyl-silyl-éther de testostérone en présence de la moindre trace d'humidité. Dans l'un ou l'autre cas, si les réactifs sont suffisamment purs, on peut procéder directement à la chromatographie gazeuse après évaporation à sec. Certains auteurs préfèrent cependant purifier l'acétate de testostérone par chromatographie sur papier ou chromatoplaque.

e. Chromatographie en phase gazeuse : en général, nous avons dissous l'extrait final dans 50  $\mu$ l d'acétone et avons procédé à des injections de 5 à 10  $\mu$ l par l'intermédiaire de l'injecteur solide. On peut aussi utiliser le sulfure de carbone qui ne donne pratiquement pas de pic en ionisation de flamme, mais c'est un mauvais solvant pour la testostérone et il faut y rajouter 10 % d'acétone. On doit aussi signaler que l'injection solide implique le chauffage du bloc d'injection à très haute température ce qui favorise avec les extraits urinaires la formation d'un résidu gommeux dans la chambre d'injection et oblige à des nettoyages fréquents. Nous avons utilisé des



colonnes d'acier inoxydable bien qu'il ait été démontré depuis que les colonnes de verre provoquent une décomposition moindre des stéroïdes au contact des parois. Le modèle du four que nous utilisions ne permettait pas l'installation commode d'un tel type de colonne et nous avons préféré utiliser une colonne incassable. Il est certain que sa réalisation nécessite beaucoup plus de précaution que celle d'une colonne de verre étant donné que l'on ne peut apprécier la qualité de la sédimentation et seule une longue expérience et des tests avec le mélange cholestérol-cholestane permettent de se rendre compte de la bonne réalisation de la colonne.

Lorsque la chromatographie gazeuse est utilisée à des fins pratiques, il est nécessaire de faire un compromis entre trois facteurs, d'une part la sélectivité, d'autre part la sensibilité et enfin un temps de rétention suffisamment court permettant la réalisation d'un nombre suffisant de dosages au cours de la même journée. C'est pour cette raison que nous avons choisi le SE 30 comme phase stationnaire car si sa sélectivité pour les stéroïdes est faible, son caractère peu polaire lui confère une grande sensibilité et sa stabilité est compatible avec des températures qui permettent de diminuer le temps de rétention. Nous avons réalisé un grand nombre d'essais avec d'autres phases stationnaires, telles : le neopentyl-glycol succinate, le DC 200, le XE 60, mais la sensibilité et la thermo-





stabilité plus grande du SE 30 nous ont toujours ramené à l'utilisation de ce type de phase stationnaire. Ainsi, dans les conditions habituelles d'utilisation, une telle colonne peut être employée pendant environ six mois.

Il restait enfin à démontrer que le produit réellement dosé était de la testostérone et que ce stéroïde n'était pas décomposé sur la colonne utilisée. Pour apporter cette preuve, nous n'avons pas pu mélanger les effluents de multiples chromatographies gazeuses d'extraits urinaires étant donné qu'il faut environ 50 µg de stéroïde pour réaliser un spectre infrarouge avec un pouvoir de résolution élevé. Nous avons donc employé l'artifice suivant : après l'absorption per os de 500 mg de testostérone, les urines de 48 heures ont été recueillies et soumises à la procédure précédemment décrite. L'effluent de la colonne a été collecté à l'aide d'un tube capillaire et son spectre infrarouge a été comparé à celui d'une même quantité de testostérone standard chromatographiée dans les mêmes conditions. Les deux spectres sont en tout point comparables comme le représente la figure 26, ce qui démontre bien que le produit effectivement dosé était la testostérone.



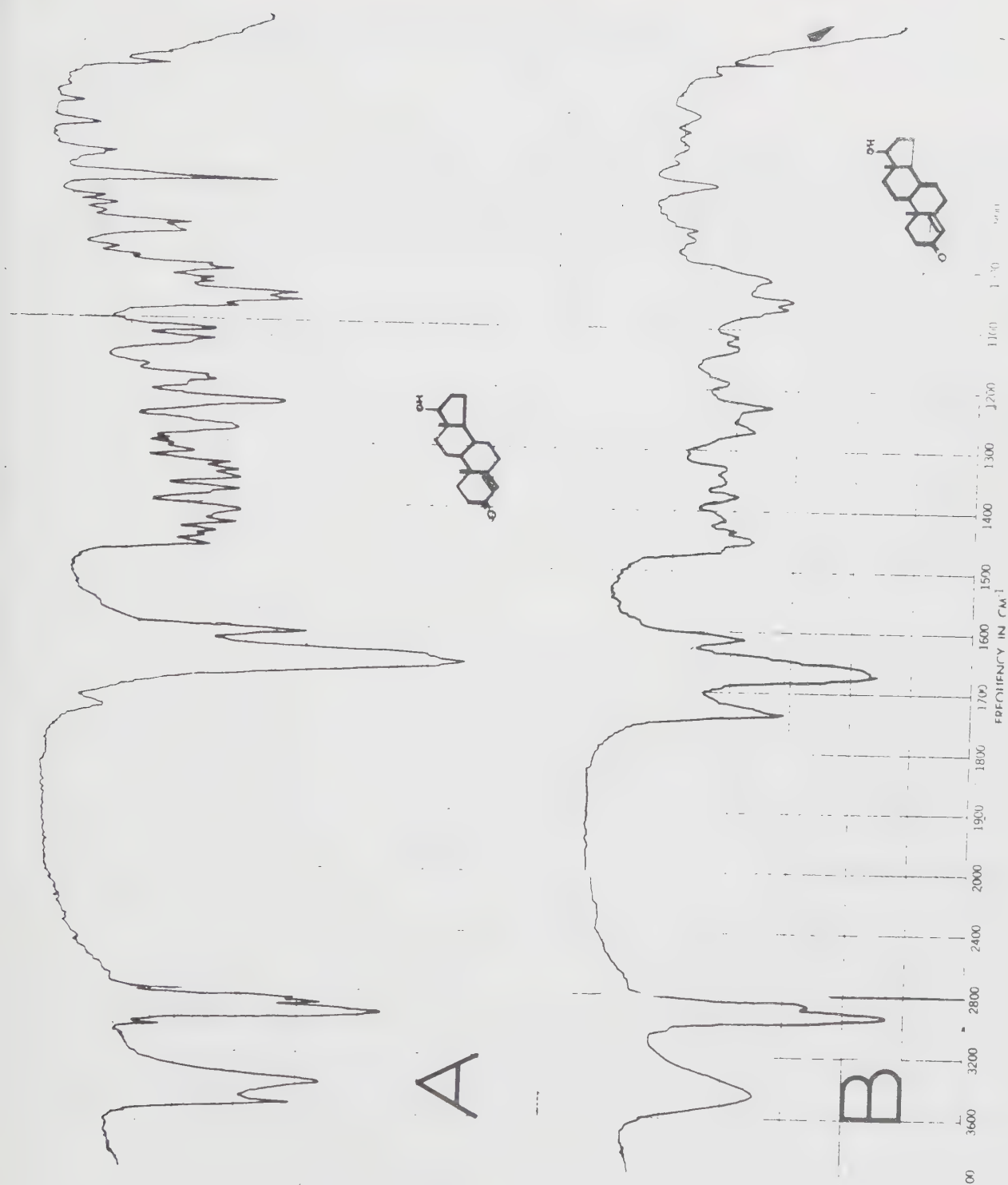


Fig. 26 Spectre infrarouge de la testostérone pure (A) et de la testostérone urinaire (B) collectées après chromatographie en phase gazeuse.



## 2. Discussion des valeurs obtenues

Nous ne reviendrons pas sur les autres techniques qui ont été employées pour le dosage de la testostérone dans l'urine, techniques que nous avons décrites précédemment. Dans le Tableau XXIV, nous avons représenté les résultats obtenus par ces techniques et par celles que nous avons décrites. Nos résultats concordent avec ceux de la plupart des auteurs tant dans les cas normaux que dans les cas pathologiques, en particulier dans l'hyperplasie surrénale congénitale, affection dans laquelle CAMACHO et MIGEON avaient déjà trouvé un taux élevé de testostérone dans l'urine.

Cependant, avant de terminer ce chapitre, il nous faut faire une remarque à propos de l'épitestostérone. La technique que nous avons décrite ne permet pas de séparer la testostérone de l'épitestostérone et même l'acétylation préalable selon la technique d'IBAYASHI (78) réalise difficilement la séparation de l'acétate de testostérone de celui d'épitestostérone. Il nous semble donc préférable de réaliser une séparation de ces deux stéroïdes à l'état libre par chromatographie sur papier, soit dans le système ligroïne/propylène-glycol, soit dans le système ligroïne/méthanol-eau (50:40:10) préconisé par LIPSETT (94). Les travaux récents en particulier de BROOKS (12) et de DE NICOLA



| SUJETS (n)                                          | AGE                     | TESTOSTERONE $\mu\text{g}/\text{Jour}$<br>m extrêmes |                         | REFERENCES              |
|-----------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Homme normal                                        | 40                      | 50                                                   |                         | Schubert et al.         |
| Hommes normaux 5                                    | 27-34                   | 69                                                   | 46-92                   | Camacho et Migeon       |
| Hyperplasie congénitale surrénalienne               | 6-1/2 M<br>14 F         | 47<br>86                                             |                         |                         |
| Hommes normaux 4                                    | 23-41<br>55-60          | 36<br>24                                             | 20-51<br>16-31          | Vermeulen et Verplancke |
| Hommes atteints d'affections non endocriniennes     | 18-42<br>45-48<br>52-60 | 54<br>42<br>40                                       | 15-90<br>18-66<br>16-58 |                         |
| Femmes normales 4                                   | 18-63                   | 8                                                    | 5-12                    |                         |
| Femmes atteintes d'hirsutisme d'origine non définie | 29                      | 34                                                   |                         |                         |
| Hommes normaux                                      |                         | 119                                                  | 58-171                  | Rosner et al.           |
| Femmes normales                                     |                         | 35                                                   | 20-60                   |                         |
| Hommes normaux 20                                   |                         | $88 \pm 6,7$ (SE)                                    | 29-143                  | Rosner et al.           |
| Femmes normales 20                                  |                         | $19,0 \pm 2,6$ (SE)                                  | 6-57                    |                         |
| Hommes normaux 9                                    | 18-28                   | 134                                                  | 57-200                  | Ibayashi et al.         |
| Hommes normaux 2                                    | 30 et 33                | 112                                                  | 111-112                 |                         |
| Hommes normaux 4                                    | 37-54                   | 64                                                   | 18-107                  |                         |
| Hommes normaux 5                                    | 59-71                   | 18                                                   | < 5-39                  |                         |
| Femmes normales 10                                  | 20-72                   | < 5,3                                                | < 5-8                   |                         |
| Hirsutisme 2                                        | 22 et 30                | 58 et 112                                            |                         |                         |
| Stein-Leventhal                                     | 33                      | 319                                                  |                         |                         |
| Syndrome de Cushing (Femmes)                        | 23<br>30<br>43          | 31<br>21<br>46                                       |                         |                         |
| Hommes normaux 10                                   | 18-28                   | 171                                                  | 65-250                  | Futterweit et al.       |
| Hommes normaux 8                                    | 30-35                   | 89                                                   | 45-110                  |                         |
| Hommes normaux 18                                   | 42-55                   | 81                                                   | 28-159                  |                         |
| Femmes normales 10                                  | 23-37                   | 6                                                    | 2,4-8                   |                         |

TESTOSTERONE DANS L'URINE HUMAINE





(27) sur le dosage de ces stéroïdes dans les urines doivent être pris en considération mais il n'est pas possible de dire encore à l'heure actuelle si les variations de l'excrétion de l'épi-testostérone représentent un intérêt quelconque en pathologie et si le rapport testostérone/épitestostérone urinaires mérite d'être déterminé.

29) Mise en évidence de sulfate de testostérone dans les urines.

a) Introduction

En 1964, CAMACHO et MIGEON (23) injectant de la testostérone-4-<sup>14</sup>C à des sujets humains récupèrent 0,002 à 0,139 % de la radioactivité dans la fraction sulfate. Plus récemment, on a pu mettre en évidence du sulfate de testostérone à partir d'incubation de testicule (32). Il est probable que si cette sulfo-conjugaison existe au niveau des gonades elle est beaucoup plus importante au niveau du foie et c'est pourquoi nous avons recherché la présence de sulfate de testostérone dans les urines d'hommes normaux (28).



b) Matériel

Le matériel que nous avons utilisé dans ce travail est sensiblement identique à celui que nous avons employé dans la détermination du glucuronide de testostérone urinaire. Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé l'appareil de chromatographie gazeuse décrit précédemment en employant une colonne similaire avec comme phase stationnaire du SE 30 à 10,5 %. Les méthodes de spectrographie infrarouge, de mesure de la radioactivité en scintillation liquide et de chromatographie sur papier et en couche mince sont celles que nous avons précédemment décrites.

c) Méthode

L'identification du sulfate de testostérone dans les urines a été réalisée à partir de plusieurs pools d'urines d'homme (3 à 7 litres). La détermination chez plusieurs sujets a été pratiquée sur 1/10 des urines de 24 heures. On extrait d'abord les stéroïdes libres (non conjugués) qui peuvent se trouver dans les urines par 0,6 volume du mélange chloroforme-éther (1:3) et on se débarrasse de cette phase organique.



Après addition de 20 % de NaCl, on extrait les conjugués par 3 fois 0,6 volume d'acétate d'éthyle. Ces trois fractions organiques sont réunies et lavées 3 fois par 0,1 volume d'eau distillée ce qui permet le passage des conjugués de la phase organique dans la phase aqueuse. Cette modification de la procédure de solvolysé préconisée par BURSTEIN et LIEBERMAN (18) nous a été suggérée par le Docteur BURSTEIN de façon à permettre une réduction du volume urinaire. On procède ensuite selon la technique classique en amenant la phase aqueuse à pH 1 avec  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 50 %. On ajoute 20 % de NaCl et une dose traceuse de testostérone-1,2- $^3\text{H}$  (0,004  $\mu\text{g}$ , A.S. = 3 mC/mg).

On reextrait les conjugués de la fraction aqueuse avec de l'acétate d'éthyle. On réunit alors les dernières fractions organiques et on les garde à 37°C pendant une nuit ce qui entraîne une hydrolyse spécifique de la fraction sulfate. On lave alors le solvant avec NaOH 1N refroidi (0,1 volume) jusqu'à ce que l'acétate d'éthyle devienne clair, puis avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité. La fraction aqueuse contient les glucuronides non hydrolysés. Enfin, l'acétate d'éthyle après passage sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre est évaporé dans un évaporateur rotatif, sous pression réduite.

L'extrait est alors appliqué sur une plaque de silicagel G et chromatographié dans le système benzène-acétate d'éthyle



(3:2). Lors de la procédure d'identification, nous avons utilisé des couches d'un mm d'épaisseur qui permettent de meilleures séparations pour des quantités importantes d'extract. Pour la détermination, nous avons utilisé des couches plus fines de 0,25 mm d'épaisseur conformément à la méthode habituelle. Après repérage de la zone radioactive correspondant à la testostérone et élution, l'éluat est appliqué sur papier et chromatographié dans le système B3. Après détection de la zone radioactive comme précédemment, on réalise l'élution par le mélange méthanol-dichlorométhane (50:50, v/v) et l'éluat est divisé en deux portions égales. La première partie de cet éluat a été, d'une part soumise à une chromatographie en phase gazeuse et d'autre part une courbe d'absorption dans l'ultraviolet a été réalisée. La deuxième moitié a été acétylée par l'anhydride acétique en milieu pyridinique et chromatographiée sur papier dans le système ligroïne/propylène-glycol. Un aliquote de cette fraction a été chromatographié en phase gazeuse. Le reste de cette fraction, après hydrolyse par du KOH méthanolique à 1 %, a été extrait par l'acétate d'éthyle et purifié par chromatographie sur papier dans le système B3. Un spectre infrarouge a été alors réalisé en milieu liquide. Cette dernière fraction a été récupérée et incubée avec une préparation de microsomes placentaires suivant la technique de RYAN (128).





#### d) Résultats

##### - Identification de la testostérone

Sur les aliquotes des deux moitiés de l'éluat, l'un non acétylé, l'autre acétylé que nous avons analysés par chromatographie en phase gazeuse, nous avons pu identifier d'une part la testostérone (T.R.R.-cholestane 0,67) et d'autre part de l'acétate de testostérone (T.R.R.-cholestane 0,84).

Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet présentait un pic très net à 240 mμ indiquant la présence d'une fonction  $\Delta_4$ -3-cétonique. L'analyse par spectrographie infrarouge a révélé la présence de bandes à 1.660 et 1.670  $\text{cm}^{-1}$  qui caractérisent la double liaison conjuguée  $\Delta_4$ -3-cétonique. La région du "fingerprint" était trop contaminée pour permettre une identification du stéroïde. Cependant, l'incubation de la fraction hydrolysée avec la préparation microsomiale nous a permis d'identifier de l'oestradiol-17β.

##### - Détermination du taux du sulfate de testostérone dans les urines.

Cette détermination a été réalisée chez trois hommes adultes normaux et nous avons trouvé des valeurs de 5,7 et 10 μg par 24 heures.



e) Discussion

- Solvolyse

Nous avons fait précéder la technique de solvolyse par une extraction des stéroïdes libres par le mélange chloroforme-éther étant donné que ROSNER et al. (124) avaient signalé la présence d'une certaine quantité de testostérone libre dans les urines des hommes adultes. Cependant, au cours de nos travaux sur la détermination du glucuronide de testostérone, nous n'avons jamais pu mettre en évidence de testostérone libre dans les urines.

Quoiqu'il en soit, nous avons vérifié que cette extraction était effective; en effet, quand on ajoute de la testostérone-1,2-<sup>3</sup>H avant l'extraction, le mélange éther-chloroforme extrait la quasi totalité de la radioactivité (97 %). Il fallait aussi démontrer que lors de la solvolyse le glucuronide de testostérone n'était pas hydrolysé. Pour vérifier ce fait, nous avons ajouté aux urines d'un jeune enfant du glucuronide de testostérone-4-<sup>14</sup>C et avons soumis ces urines au procédé précédemment décrit. Nous n'avons pas retrouvé de radioactivité dans la fraction contenant les stéroïdes libres provenant des esters sulfates.

- Identification

Cette identification repose sur trois ordres de critères :



1. des critères chromatographiques tant sur papier que sur couche mince et qu'en phase gazeuse où la testostérone et son acétate avaient le même Rf et le même temps de rétention que la testostérone ou que son dérivé acétylé.

2. des critères spectrographiques tant dans l'ultraviolet que dans l'infrarouge révélant la présence d'une fonction  $\Delta_4$ -3-cétonique.

3. des critères biochimiques : l'aromatisation en 17 $\beta$ -oestradiol, critères qui méritent d'être discutés un peu plus longuement. En effet, un certain nombre de stéroïdes, dont la testostérone, contenus dans les urines, peuvent être aromatisés par les enzymes placentaires. Nous avons pu exclure d'emblée la présence d'androstènedione étant donné que si elle existe, elle se trouve sous forme libre et doit être complètement extraite par l'éther-chloroforme. Aucune trace de déhydroépiandrosterone n'a pu être décelée ni par chromatographie sur papier ni par chromatographie en phase gazeuse et la spectrographie infrarouge ne nous a révélé la présence ni de fonction 3 $\beta$ -ol ni de double liaison en position  $\Delta_5$ . Seule la présence de sulfate d'épitéstostérone contaminant peut être discutée; en effet, la testostérone et l'épitéstostérone ont en chromatographie sur couche mince un Rf peu différent (0,61 pour la testostérone et 0,66 pour l'épitéstostérone) et ne sont donc pas séparées. Cependant,



par chromatographie sur papier dans le système Bush B3, les Rf sont respectivement de 0,52 et de 0,62. Lorsque le problème de la contamination de la testostérone par l'épitestostérone a été soulevé, nous avons réalisé l'expérience suivante : nous avons ajouté une quantité égale de testostérone et d'épitestostérone à des urines ne contenant pas de stéroïdes et nous les avons soumises à la méthode précédemment décrite. En fin d'expérience, moins de 4 % d'épitestostérone contaminent la fraction testostérone. On peut donc en déduire que le sulfate d'épitestostérone urinaire dont la présence a été détectée par DRAY et al. (37) ne peut être présent dans l'extrait qu'à l'état de traces.

On peut nous reprocher de ne pas avoir identifié le sulfate de testostérone. Cependant, les faits précédents ne laissent guère de doute sur son existence dans les urines humaines. Les taux que nous avons trouvés sont en accord avec les valeurs publiées par CAMACHO et MIGEON (23). Cependant, le pourcentage de testostérone à l'état de sulfate n'excède pas 10 % de la totalité de la testostérone conjuguée dont la majeure partie est sous forme de glucuronide.

On peut donc en conclure que l'hydroxyle en 17 $\beta$  se comporte comme les hydroxyles en 3 $\alpha$ , vis-à-vis des systèmes de conjugaison hépatique et qu'il se conjugue principalement à l'acide glucuronique.





III

ETUDE DES METABOLITES URINAIRES DE LA TESTOSTERONE



### III - ETUDE DES METABOLITES URINAIRES DE LA TESTOSTERONE

---

#### A) HISTORIQUE

##### 1°) Métabolisme de la testostérone

La testostérone circulante dont l'origine est presque exclusivement testiculaire chez l'homme, est très rapidement épurée de l'organisme. En effet, après injection de testostérone  $4\text{-}^{14}\text{C}$ , 50 % de la radioactivité disparaissent du plasma en 8 à 10 minutes. Cependant, il faut environ 48 heures pour que toute la radioactivité soit éliminée, cette élimination se faisant presque totalement par les urines, 4 % seulement par les fèces. Ce métabolisme a lieu essentiellement dans le foie et on peut considérer comme négligeable le métabolisme extra-hépatique (musculaire, prostatique). Mais à l'encontre de ce qui se produit pour l'aldostérone par exemple, l'extraction hépatique de la testostérone est incomplète. Sa clearance métabolique est de 600 à 1.000 litres par jour pour un flux sanguin de 1.500 litres.

Les destinées de la testostérone sont multiples et sont représentées sur la figure 27.



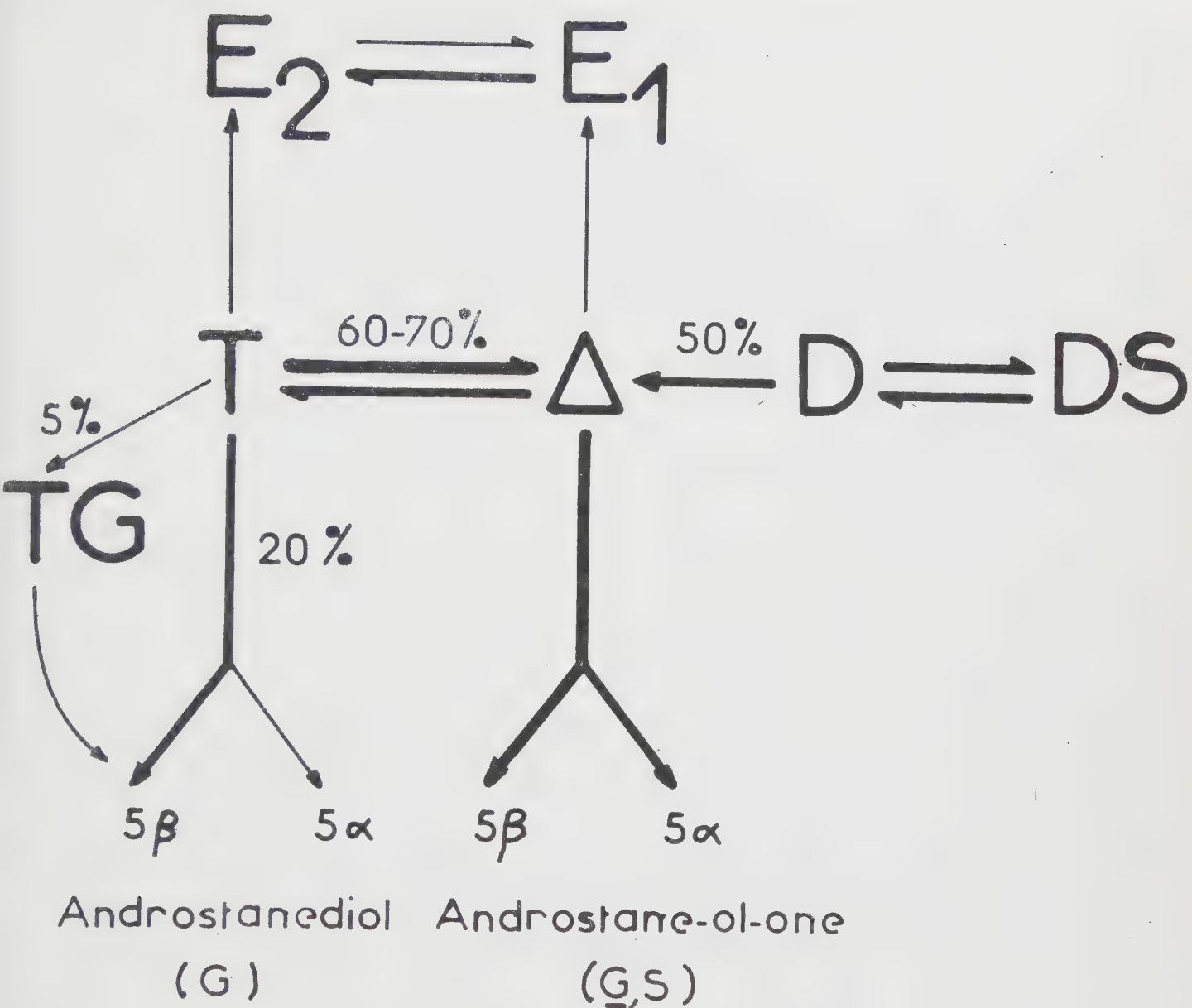


Fig. 27

Métabolisme de la testostérone (Testostérone (T), Androstènedione ( $\Delta$ ), Déhydroépiandrostérone (D), Sulfate de déhydroépiandrostérone (DS), Glycuronide de testostérone (TG), Oestrone ( $E_1$ ), Oestradiol-17 $\beta$  ( $E_2$ )).



a) Réduction directe de la testostérone (voie des diols).

La testostérone va d'abord être soumise à l'action d'une  $5\alpha$ -et d'une  $5\beta$ -réductase particulièrement étudiée par FORCHIELLI et al. (52) et TOMKINS et al. (111). Ces enzymes, qui ont pour coenzyme préférentiel le NADPH, sont localisés, le premier dans les microsomes, le second dans le surnageant. Ils vont donner lieu à la formation de  $17\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane-3-one et  $17\beta$ -hydroxy- $5\beta$ -androstane-3-one par une réaction irréversible. Le rapport  $5\beta/5\alpha$  varie suivant l'âge et le sexe. Chez l'homme, le composé  $5\beta$  est prédominant. Il est intéressant de noter ici que le composé  $5\beta$  est dépourvu d'activité androgénique, contrairement au dérivé  $5\alpha$ . Dans une deuxième étape, ces composés sont soumis à l'action des déshydrogénases agissant en position  $3\alpha$  essentiellement et accessoirement en position  $3\beta$ . Ces enzymes qui admettent comme coenzyme préférentiel le NADH et agissent de façon réversible, donnent naissance à quatre androstanediols, dont la formule est représentée sur la figure 28. Le composé majoritaire est le  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol. Cependant, comme précédemment, les composés  $5\alpha$  conservent une activité biologique non négligeable et tout particulièrement le composé  $3\alpha$ -hydroxylé, qui est présent en quantité plus importante que le composé hydroxylé en position  $3\beta$ . Dans une troisième étape, ces  $3\alpha$ -hydroxy-androstanes





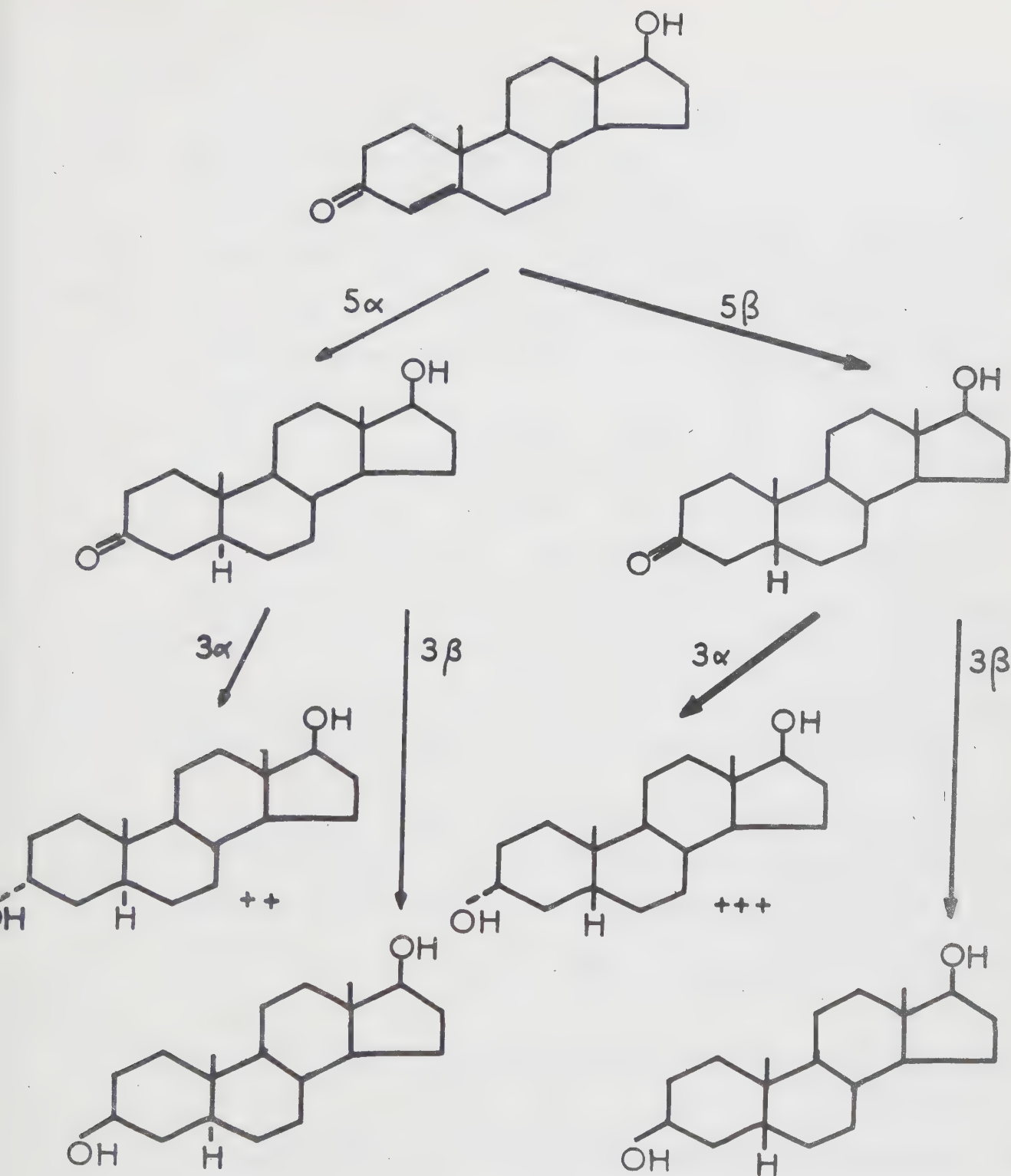


Fig. 28

Métabolisme direct de la testostérone (voie des diols).



vont être conjugués en majeure partie à l'acide glucuronique par une liaison  $\beta$ -osidique. Dans les urines, on ne trouve que des traces d'androstanediol qui est vraisemblablement un mono-glucuronide conjugué en position 17 et peut-être 3 (P. ROBEL, com. pers.). Ces composés passent presque totalement dans le sang; 10 % seulement passent dans la bile et sont partiellement réabsorbés dans un cycle entéro-hépatique. Le passage dans les urines de ces tétrahydro-dérivés se fait de façon extrêmement rapide, car leur clearance rénale est supérieure à la clearance de la créatinine. On a donc pensé que, outre la filtration glomérulaire, il existait probablement une excrétion tubulaire. Certains auteurs ont discuté l'ordre des deux premières étapes et il est possible que pour une très faible partie des métabolites, la réduction en 3 précède celle en position 5.

Quoiqu'il en soit, cette voie directe de catabolisme de la testostérone ne représente pas plus de 20 à 25 % de la testostérone métabolisée dans l'organisme (BAULIEU E.-E. et MAUVAIS-JARVIS P., J. Biol. Chem., 239, 1569 et 1578, 1964).

b) Réduction indirecte de la testostérone (fig. 29).

Au cours d'une première étape, la testostérone va être oxydée en androstènedione, sous l'action d'une 17 $\beta$ -déshydrogénase agissant de façon réversible et, qui, au niveau du foie,



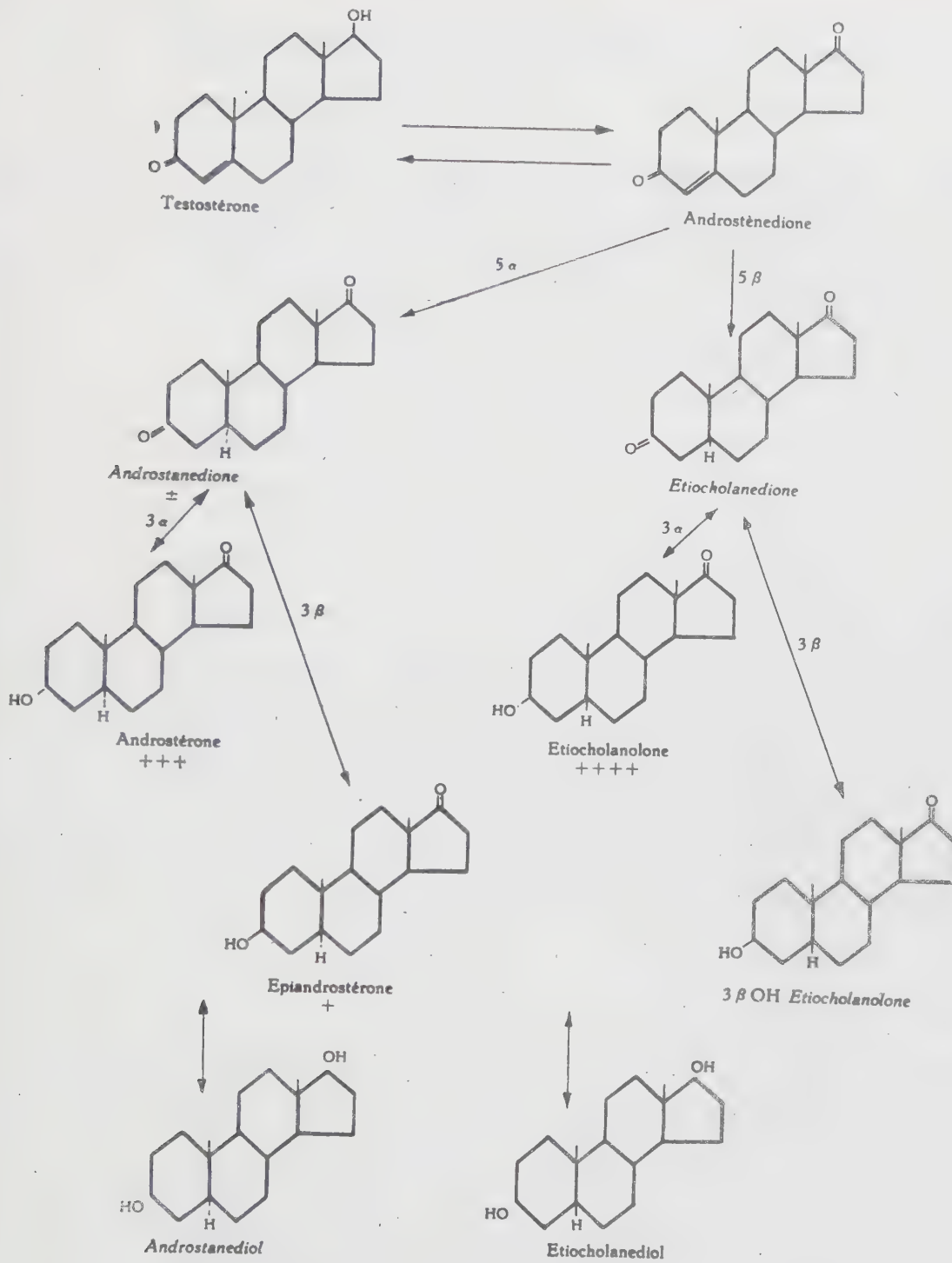


Fig. 29

Métabolisme indirect de la testostérone (voie des diones).



agit de façon préférentielle dans le sens testostérone-androstènedione (60 à 70 %).

Puis, comme dans la voie précédente, l'androstènedione va subir l'action d'une 5-réductase et d'une 3-hydroxystéroïde-déshydrogénase. Ainsi, dans la première étape, nous aurons la formation de 5 $\alpha$ - et de 5 $\beta$ -androstane-3,17-dione. Le rapport 5 $\beta$ /5 $\alpha$  varie suivant l'âge, le sexe et diverses circonstances pathologiques. Normalement, il est voisin de 2, comme l'a montré DOBRINER (55). Chez le sujet jeune, la quantité de composé 5 $\alpha$  s'élève, ainsi que chez l'adulte mâle et au cours de l'hyperthyroïdie. Sous l'action de deux nouvelles déshydrogénases (3 $\alpha$  et 3 $\beta$ ), admettant de façon préférentielle le NADH comme coenzyme, les composés dihydrogénés vont être transformés en composés tétrahydrogénés par une réaction réversible, donnant naissance par ordre d'importance croissante à la 3 $\beta$ -étiocholanolone, l'épiandrostérone, l'androstérone et enfin l'étiocholanolone. Cependant, si ces trois derniers métabolites tétrahydrogénés sont quantitativement importants, ils ne représentent respectivement que 2, 8 et 10 % de la testostérone initiale. Enfin, une très faible partie de ces derniers métabolites peut subir l'action d'une 17 $\beta$ -déshydrogénase pour donner naissance à divers types d'androstanediols et d'étiocholanediols. Tous ces métabolites vont alors être conjugués, les 3 $\beta$ -hydroxy-





stéroïdes étant presque exclusivement sulfoconjugués et les  $3\alpha$ -hydroxystéroïdes étant glucuroconjugués à 80 % pour l'androstérone et à 90 % pour l'étiocholanolone. Les 17-cétostéroïdes vont, comme les androstanediols, passer de façon presque exclusive dans le torrent circulatoire.

Du fait de la clearance rénale très faible des sulfates (10 ml par minute), on retrouve dans le sang beaucoup plus de sulfo- que de glucuroconjugués : moins de 5  $\mu$ g de glucuroconjugués pour 100 ml de plasma, alors que l'on retrouve 50  $\mu$ g de sulfate d'androstérone, 50  $\mu$ g de sulfate d'épiandrostérone et environ 10  $\mu$ g de sulfate d'étiocholanolone (J. SJOVALL et R. VINKOY) (Abstract n° 29, Milan, 1966). Ce métabolisme donne naissance, comme dans la voie précédente, à des composés qui ne sont pas tous dépourvus de pouvoir androgénique; le pouvoir androgénique de l'androstènedione varie de 80 % à 12 % suivant les tests, quand on le compare à l'action de la testostérone et celui de l'androstérone est d'environ 10 % dans le test d'application locale sur la crête du chapon. A l'opposé, l'étiocholanolone ( $3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -androstane-17-one) est dépourvue de tout pouvoir androgène. Signalons au passage deux activités très particulières de certains 17-cétostéroïdes libres du plasma : l'étiocholanolone libre est un stéroïde pyrogène et ce fait a été vérifié par son administration par voie intramusculaire ou



endoveineuse. D'autres stéroïdes de la série des prégnanes sont aussi pyrogènes et il est possible que leur activité soit due à une transformation en étiocholanolone (4).

L'androstérone libre est hypocholestérolémiant (71) et l'on sait que l'insuffisance thyroïdienne s'accompagne d'une élévation de la cholestérolémie et d'une baisse du cholestérol libre du plasma. Certains auteurs ont donc pensé que la thyroxine abaissait le taux du cholestérol sanguin par l'intermédiaire de son action sur le taux de l'androstérone circulante. Cette hypothèse est peu probable. En revanche, la thyroxine augmente le taux de la  $5\alpha$ -réductase hépatique.

c) Formation de glucuronide de testostérone.

Environ 5 % de la testostérone sécrétée vont être directement conjugués au niveau du foie pour former du glucuronide de testostérone. 20 % de ce conjugué passent directement dans les urines représentant donc approximativement 1 % de la testostérone sécrétée. Le glucuronide de testostérone peut être réduit directement sans hydrolyse préalable en un dérivé  $5\beta$ , c'est-à-dire en un glucuronide d'étiocholanediol. Ce fait a été démontré par ROBEL et al. (122) qui, injectant du glucuronide de testostérone doublement marqué (17-glucuronide- $^{14}\text{C}$  de testo-



stérone- $^3\text{H}$ ) ont obtenu du 17-glucuronide- $^{14}\text{C}$  de 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol- $^3\text{H}$ , dont le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  était sensiblement identique à celui du glucuronide de testostérone de départ.

Au cours de la même expérience, ces mêmes auteurs ont aussi isolé du glucuronide de 5 $\beta$ -androstérone uniquement marqué par du tritium. Il semble donc que, dans le cas de ce 17-cétostéroïde, une hydrolyse a précédé les étapes de réduction suivie d'une nouvelle conjugaison avec de l'acide glucuronique non marqué.

Comme nous l'avons déjà vu au chapitre précédent, nous avons pu isoler du sulfate de testostérone dans les urines, mais ce conjugué est minoritaire, étant donné qu'il ne représente que 0,002 à 0,139 % de la testostérone-4- $^{14}\text{C}$  injectée, selon CAMACHO et MIGEON (23). Il est aussi possible qu'une infime quantité de testostérone passe directement dans les urines sans être conjuguée (124).

#### d) Formation d'oestrogènes.

Grâce à la présence du système enzymatique d'aromatisation testiculaire, la testostérone peut être transformée directement en oestradiol alors que l'androstènedione est transformée en oestrone. Cependant, si cette transformation est





indubitable, le pourcentage de la testostérone transformée en oestrogène est quantitativement extrêmement faible.

Ainsi, il semblerait que l'appréciation du pourcentage des différents métabolites de la testostérone soit aisée à déterminer, étant donné que tous ces métabolites sont éliminés dans les urines (pratiquement pas de métabolites dans les matières fécales, ni dans l'air expiré). Cependant, lorsque l'on administre de la testostérone radioactive, on ne retrouve que 80 % de la radioactivité dans les urines et sur ces 80 % seulement la moitié représente des métabolites connus, dont les 4/5 sont glucuroconjugués et 1/5 sulfoconjugués. Il est toutefois extrêmement difficile de donner une estimation même approximative de la transformation de la testostérone en ces divers métabolites, étant donné que cette testostérone est en équilibre avec l'androstènedione, stéroïde qui lui-même peut provenir aussi de la déhydroépiandrostérone, dont l'origine majeure est le sulfate de déhydroépiandrostérone secrété en quantité importante par la corticosurrénale.

Les épreuves de suppression de la sécrétion corticosurrénale par les corticostéroïdes de synthèse permettent seules de se rendre compte de façon plus exacte de la part testiculaire dans la production des 17-cétostéroïdes urinaires.





2°) Technique de séparation des métabolites urinaires par chromatographie d'adsorption.

Ce sont CALLOW et al. qui en 1939 (21) ont utilisé les premiers la chromatographie d'adsorption pour la séparation des 17-cétostéroïdes. Les stéroïdes urinaires, dissous dans  $\text{CCl}_4$ , sont adsorbés sur une colonne d'alumine, l'élution étant effectuée par des volumes différents de  $\text{CCl}_4$  contenant des proportions croissantes d'éthanol. Cependant, c'est à DINGEMANSE et al. (30, 31) que l'on doit le véritable essor de la chromatographie d'adsorption des 17-cétostéroïdes. L'extrait est dans sa technique fixé sur alumine Brockman, puis élué successivement par du benzène contenant 0,1 et 0,5 % d'éthanol. Le dosage des 17-cétostéroïdes réalisé sur les différents éluats, fait apparaître 8 fractions distinctes, dont la déhydroépiandrosterone et l'épiandrosterone représentent les éléments principaux de la fraction III, l'androsterone étant le stéroïde principal de la fraction IV et l'étiocholanolone celui de la fraction V. Les fractions VI et VII comprennent les 11-oxy-17-cétostéroïdes. Cette technique qui a été très longtemps employée, présente un certain nombre de désavantages, du fait qu'elle nécessite de grandes quantités d'urine et de solvant et que l'hydrolyse à chaud, en présence d'HCl donne naissance à de nombreux dérivés non physiologiques (dérivés de dégradation et dérivés chlorés).



A peu près à la même époque, DOBRINER, LIEBERMAN et al. (33) ont réalisé une séparation extrêmement poussée des divers 17-cétostéroïdes urinaires en utilisant des séparations chimiques et chromatographiques effectuées, soit sur alumine, soit sur silicate de magnésie avec des éluants de polarité progressivement croissante. Mais il ne s'agit là que d'un travail de recherche.

La méthode de fractionnement chromatographique des 17-cétostéroïdes, selon DINGEMANSE a été améliorée par ROBINSON et GOULDEN (123), ce qui a permis son application en physiopathologie. DEVIS (29), MARTI (108), PLANTIN et BIRKE (119) ont aussi apporté des modifications à cette méthode pour son application en clinique. Cependant, nous voudrions surtout insister sur les micro-méthodes d'application beaucoup plus courante du fait de la réduction de la quantité d'adsorbant, des extraits urinaires et des éluats.

POND (120) a été le premier dès 1951 à réaliser une telle méthode nécessitant seulement 1 à 2 mg de 17-cétostéroïdes, l'élution étant réalisée par du benzène contenant des quantités croissantes d'éthanol. ZYGMUNTOWICZ et al. (164) ont réussi, dès la même année, à fractionner 300 µg de 17-cétostéroïdes sur 1 g d'alumine en utilisant comme éluant du benzène contenant des quantités croissantes de méthanol. En 1953,



HENRY et THEVENET (73) ont proposé une micro-technique voisine dont l'avantage majeur réside dans l'hydrolyse enzymatique au moyen de la  $\beta$ -glucuronidase et la sulfatase du suc digestif d'Helix Pomatia, ce qui élimine les artéfacts résultant de l'hydrolyse acide. Cependant, cette technique qui sépare bien la déhydroépiandrostérone de l'androstérone, ne sépare pas toujours très bien l'androstérone de l'étiocholanolone. C'est pour cette raison que HENRY a récemment modifié sa technique en remplaçant l'élution par paliers par une élution graduelle (72). En 1956, JOHNSEN (83) a proposé une méthode rapide et particulièrement ingénieuse de chromatographie sur colonne d'alumine (3,1 g) séparant de façon convenable la déhydroépiandrostérone, l'androstérone et l'étiocholanolone, l'élution étant réalisée par du benzène contenant des quantités croissantes d'alcool éthylique. Toutes ces techniques, bien que d'application assez aisée, n'en ont pas moins l'inconvénient de comporter un grand nombre de fractions qui impliquent autant de dosages des 17-cétostéroïdes (33 tubes dans la méthode de JOHNSEN qui est l'une des plus simples).

D'autres supports ont été utilisés, tels que le silica-gel par JOHNSON et al. (84) ou l'amberlite par SEKI et al. (138).

La chromatographie par élution graduelle a été appliquée pour la première fois au fractionnement des 17-cétostéroïdes



par LAKSHMANAN et LIEBERMAN (97). Cette méthode sépare de façon parfaite les divers 17-cétostéroïdes urinaires. Elle a été légèrement modifiée par STAIB et SHILD (148) pour en rendre l'application plus facile en physiopathologie, puis par KELLIE et WADE (89) qui ont mis au point un appareil à élution graduelle légèrement différent de celui de LAKSHMANAN et LIEBERMAN. Enfin, nous ne ferons que citer la méthode de STAIB et al. (147) qui utilise le fractionnement chromatographique sur alumine des 17-cétostéroïdes sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazone.

#### B) CONTRIBUTION PERSONNELLE.

Entre les méthodes de dosage global des 17-cétostéroïdes, après hydrolyse acide ou enzymatique et les méthodes les plus raffinées de fractionnement utilisant en particulier l'élution graduelle, il restait place pour une méthode rapide et facilement réalisable en analyse physiopathologique (38).

L'objet de notre travail a été de mettre au point une telle méthode ne comportant que la séparation en trois fractions

- . déhydroépiandrosterone (DHA)
- . androstérone et étiocholanolone (fraction A + E)
- . 17-cétostéroïdes oxygénés en 11 (11-oxy 17-CS).







La déhydroépiandrosterone, ainsi que les 17-cétostéroïdes 11-oxygénés sont d'origine exclusivement corticosurrénale, alors que l'androsterone et l'étiocholanolone sont d'origine mixte, gonadique et corticosurrénale; mais les variations de ces deux derniers stéroïdes peuvent être interprétées de façon valable, grâce à l'utilisation de tests dynamiques utilisant soit le freinage de l'activité corticotrope de l'hypophyse par les corticostéroïdes de synthèse, soit la stimulation gonadique par la gonadotropine chorionique, soit enfin une combinaison de ces deux techniques.

## 1<sup>o</sup>) Méthode

### a) Recueil des urines et hydrolyse

Les urines de 24 heures sont recueillies sur 2 ml d'acide mercurithiosalicylique (merseptyl à 1 %) et 0,5 ml de chloroforme, et conservées en chambre froide.

Lorsque le taux des 17-cétostéroïdes totaux est supérieur ou égal à 10 mg p. 1000, on part de 25 ml d'urine que l'on introduit dans un tube à centrifuger de 90 ml; entre 5 et 10 mg de 17-cétostéroïdes totaux p. 1000, on répartit 50 ml d'urine dans deux tubes.



Au-dessous de 5 mg de 17-cétostéroïdes p. 1000, on part de 100 ml d'urine. On amène le pH aux environs de 4,7 par addition d'acide acétique et on ajoute 15 p. 100 de tampon acéto-acétique 2M, pH 4,7. L'hydrolyse se fait, soit à l'autoclave à 120° C, pendant 60 minutes, soit par ébullition à reflux pendant 4 heures. Ce mode opératoire permet d'hydrolyser de façon spécifique le sulfate de déhydroépiandrostérone, en accord avec la technique de BITMAN et COHEN (5) modifiée par JAYLE et MALASSIS (81). Après l'hydrolyse, on vérifie que le pH ne dépasse pas 6. On filtre les urines, si nécessaire.

b) Extraction de la déhydroépiandrostérone libérée.

Si on est parti de 25 ml d'urine, on ajoute dans chaque tube 25 ml de chlorure de méthylène. On bouche hermétiquement avec un bouchon de polyéthylène et on agite 20 fois par retournement. On centrifuge si nécessaire à 3.000 tours/minute pendant 3 minutes. Le contenu de ces tubes est versé quantitativement dans une ampoule à décantation de 75 ml de capacité. La couche de chlorure de méthylène est décantée dans le même tube à centrifuger.

La phase urinaire qui vient d'être extraite est introduite quantitativement dans un erlenmeyer de 100 ml et mise de côté pour l'opération suivante.



On ajoute dans le chlorure de méthylène 30 pastilles de NaOH R.P.. Les tubes sont placés dans un agitateur à secousses pendant 3 minutes et centrifugés à 3.000 tours/minute pendant 3 minutes.

On transfère la majeure partie du chlorure de méthylène dans un erlenmeyer et on prélève 20 ml que l'on évapore à sec, dans un tube de dosage de 60 ml, dans un évaporateur approprié. On effectue directement dans ce tube la réaction de ZIMMERMAN, selon la méthode de JAYLE et al. (80), ce qui donne le taux de la déhydroépiandrostérone, que l'on rapporte aux urines de 24 heures.

c) Hydrolyse enzymatique des 17-cétostéroïdes conjugués restants.

Le pH des urines provenant de l'opération précédente est ramené aux environs de 5,2 par addition d'acide acétique. L'urine est tamponnée par addition de 10 % de solution tampon acéto-acétique 2M, pH 5,2. On ajoute 2.000 Unités par ml de  $\beta$ -glucuronidase d'Helix Pomatia et on place l'erlenmeyer à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.



d) Extraction des 17-cétostéroïdes libérés.

L'hydrolysate urinaire est introduit dans un tube à centrifuger de 90 ml. On ajoute 25 ml de chlorure de méthylène pour 25 ml d'hydrolysate. L'extraction est réalisée pendant 3 minutes dans un agitateur à secousses. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3.000 tours/minute, pendant 3 minutes et on élimine ensuite par aspiration la couche aqueuse supérieure; on ajoute alors 30 pastilles de soude par tube. Après agitation pendant 3 minutes et centrifugation (3.000 tours/minute, pendant 3 minutes), on transfère la quasi-totalité du chlorure de méthylène dans un tube propre; on prélève à la pipette ou à la burette, d'abord 2,5 ml dans 2 tubes à essais que l'on évapore à sec, puis 15 ml pour la chromatographie.

Si on est parti de 50 ml d'urine, l'hydrolysate urinaire est réparti dans 2 tubes à centrifuger et l'on procède comme précédemment, pour l'extraction de la déhydroépiandrosterone, puis des 17-cétostéroïdes restants. A la fin de l'opération, on prélève d'une part pour la chromatographie 15 ml de chlorure de méthylène dans chaque tube que l'on mélange dans un erlenmeyer (ces 30 ml de solvant correspondant à 30 ml d'urine); d'autre part, on mesure dans deux tubes à essais 5 ml de chlorure de méthylène pour le dosage des 17-cétostéroïdes totaux restants.





Lorsqu'on est parti de 100 ml d'urine, l'extraction est réalisée à deux reprises par 50 ml de chlorure de méthylène dans une allonge au moyen d'un extracteur rotatif (80 tours/minute) pendant 10 minutes chaque fois. On lave par 2 fois 0,2 volume de soude N, pendant 15 minutes puis par 2 fois 0,1 volume de H<sub>2</sub>O distillée pendant le même temps. Le chlorure de méthylène de l'opération finale est versé dans une fiole jaugée de 100 ml; on complète au besoin. On prélève 10 ml dans 2 tubes pour le dosage des 17-cétostéroïdes totaux restants. Le reste (80 ml) est évaporé pour la chromatographie.

e) Chromatographie.

Les 15 ml de chlorure de méthylène dans la première éventualité, les 30 ml dans la seconde, ou les 80 ml dans la troisième, sont évaporés à sec et sont repris par 10 ml de benzène hydraté. Il faut prendre soin de dissoudre totalement l'extrait en grattant soigneusement le fond de l'erlenmeyer avec un petit agitateur; au besoin, on peut légèrement tiédir l'erlenmeyer en le plongeant quelques secondes dans un bain-marie tiède. L'erlenmeyer est bouché; on attend 2 à 3 minutes que la dissolution soit complète. En se basant sur le chiffre des 17-cétostéroïdes totaux restants, on fait passer sur la



colonne d'alumine une quantité de stéroïdes correspondant à  $250 \pm 100$   $\mu$ g dans un volume de benzène compris entre 5 et 7 ml.

- Colonne de chromatographie :

Pour faciliter encore l'usage de cette technique en pratique, nous avons fait réaliser une colonne directement soudée au réservoir (fig. 30). La colonne est formée d'un tube de verre pyrex calibré de  $4 \pm 0,02$  mm de diamètre intérieur terminée par un robinet et surmontée d'un réservoir ayant une contenance de 100 ml.

- Préparation de la colonne d'alumine :

Un petit tampon de coton de verre (Prolabo) hyperfin est introduit dans la colonne et tassé au-dessus de l'étranglement à l'aide d'une mince baguette de verre. Le robinet inférieur est fermé; on verse alors du benzène hydraté de façon à ce que son niveau soit un peu supérieur à la portion rectiligne de la colonne. On pèse 0,9 g d'alumine que l'on verse en pluie fine dans le benzène. L'alumine sédimente lentement. On tapotte légèrement la colonne pour que la sédimentation soit bien homogène.

La colonne est alors placée sur son support. On branche l'air comprimé ou l'azote par l'intermédiaire du robinet à trois voies. Le robinet inférieur est ouvert, puis on ouvre



le robinet d'admission, de façon à évacuer le benzène en prenant bien garde de ne pas laisser la colonne à sec, c'est-à-dire que le niveau du solvant reste à environ 1 cm au-dessus de la limite supérieure de la colonne d'alumine.

- Adsorption de l'extrait urinaire :

L'extrait benzénique est alors versé sur la colonne. On ouvre le robinet inférieur, puis celui de l'air comprimé comme précédemment en maintenant une vitesse d'écoulement d'environ une goutte par seconde. On rince l'erlenmeyer par 2, puis 3 ml de benzène hydraté que l'on fait passer sur la colonne d'alumine.

- Elution :

On verse dans le réservoir 70 ml de benzène hydraté à 0,1 % d'éthanol. On place sous la colonne un erlenmeyer ou un ballon spécial muni d'une petite dépression inférieure destinée à recueillir le mélange androstérone-étiocholanolone. On règle le débit comme plus haut. L'élution de cette fraction est terminée en 75 à 90 minutes environ. Puis on verse dans le réservoir 10 ml de benzène-éthanol à 4 %, ce qui permet d'éluer les 17-cétostéroïdes oxygénés en 11.



f) Dosage des fractions A + E et 11-oxy 17-CS

Les 70 ml de benzène dans le premier cas et les 10 ml dans le deuxième sont évaporés dans un bain-marie à 60°C sous courant d'air ou d'azote. Les stéroïdes sont dissous dans 1 ml d'éthanol; le dosage est fait en double sur 0,2 ml, suivant la technique habituelle.

g) Calcul des résultats

- Taux de la DHA : il est calculé d'après la densité optique, corrigée en appliquant l'équation d'ALLEN, la correction apportée étant souvent appréciable.

- Taux de la fraction A + E : on obtient la quantité d'androstérone et d'étiocholanolone dans la prise d'essai en équivalent de DHA. On rapporte au litre et à la diurèse des 24 heures. Tous les résultats ont été calculés à 520 mμ et en appliquant la correction d'ALLEN. Les valeurs sont sensiblement identiques, ce qui montre que cette fraction est pratiquement indemne de pigments.

- Taux des 11-oxy 17-CS : il est exprimé comme précédemment en équivalent de DHA en appliquant de façon systématique





la correction d'ALLEN, car cette dernière fraction est en règle assez pigmentée.

On obtient ainsi les valeurs des 3 fractions : DHA, A + E et 11-oxy 17-CS.

## 2°) Recherches expérimentales

### a) Standardisation de l'alumine.

Nous avons essayé trois lots d'alumine MERCK BROCKMAN II - III; nous avons constaté en employant la méthode de HESSE (74), où l'activité de l'alumine est évaluée en déterminant la quantité maximum d'azo-benzène qu'elle peut fixer, et celle de ROBINSON et GOULDEN (123), où l'alumine est testée par un mélange de rouge soudan et de jaune soudan dissous dans du benzène (l'alumine est considérée comme correcte (type III) lorsque la bande jaune atteignant le bas de la colonne, la bande rouge est descendue de 10 mm.), que ces lots correspon- daient à la définition de BROCKMAN et SCHODDER (11) et ne présentaient pas entre eux de différence appréciable.

Cependant, nous nous sommes aperçus que, suivant les lots, la zone de passage de la fraction A + E se déplaçait, soit vers la droite, soit vers la gauche. La méthode des



colorants n'est donc pas suffisamment précise, lorsqu'on l'applique à de très petites quantités d'alumine. Il est nécessaire d'utiliser un stéroïde de référence comme l'androstérone, par exemple, et de rechercher une alumine qui assure son élution dans une fraction bien définie de l'éluat. Nous avons adopté l'alumine la moins active qui assure le passage de l'androstérone du 3ème au 5ème-6ème tube, chaque fraction étant de 7 ml (toute l'expérimentation a été réalisée avec un collecteur de fractions TOWERS, modèle A, à siphon. Un siphon de 7 ml a été le plus couramment employé). Pour obtenir une telle alumine à partir d'une alumine plus active, nous recourons à la méthode de ROBINSON et GOULDEN, qui consiste tout simplement à disposer un échantillon d'alumine en couche mince de 2 à 3 mm dans une boîte de Pétri. A la 6ème, 12ème, 18ème et 24ème heures, on en prélève un aliquote que l'on teste avec l'androstérone. Lorsque le temps nécessaire à la désactivation a été déterminé, on hydrate dans les mêmes conditions tout le lot d'alumine en le déposant sur de grands plateaux de verre. On répartit ensuite l'adsorbant dans des flacons de 100 à 150 ml hermétiquement bouchés, que l'on utilisera au fur et à mesure des besoins. Nous avons également cherché à apprécier l'influence du diamètre des grains sur l'activité de l'alumine. Par tamisage,



nous avons sélectionné les grains ayant un diamètre inférieur à 0,125 et supérieur à 0,050 mm. Nous avons constaté que la zone d'élution de l'androstérone n'était nullement modifiée par cette opération et nous pensons que l'on peut utiliser l'alumine MERCK BROCKMAN II - III sans tamisage préalable, mais après avoir testé son activité.

b) Etude de l'élution des corps purs

Pour étudier les zones de passage des différents 17-cétostéroïdes, nous nous sommes servis des corps purs suivants : androstérone, étiocholanolone, 11-céto-androstérone, 11-céto-étiocholanolone, 11-hydroxy-étiocholanolone.

- 17-cétostéroïdes non oxygénés en 11 :

L'androstérone passe du 3ème au 5-6ème tube de la solution de benzène-éthanol avec un pic au niveau du 4ème pour 100 µg de ce corps (fig. 31 et 32). L'étiocholanolone passe du 5ème au 8ème tube débordant parfois sur le 4ème et le 9ème, avec un pic au niveau du 6ème pour 100 et 150 µg de ce corps (fig. 33).

- 17-cétostéroïdes oxygénés en 11 :

. 11-céto-androstérone : nous nous sommes surtout servis de ce stéroïde, puisqu'il est le moins polaire des 11-oxy 17-CS. Sa zone de passage se situe en général entre le 13ème et le



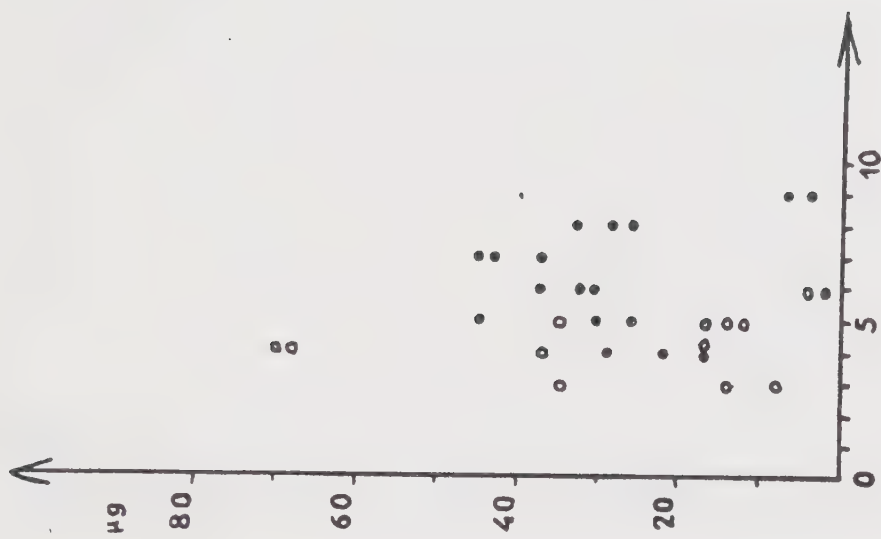


Fig. 31

Zone de passage du mélange androstérone et étiocholanolone pures : passage du 3ème au 9ème tubes.  
(O = androstérone pure - ● = étiocholanolone pure).

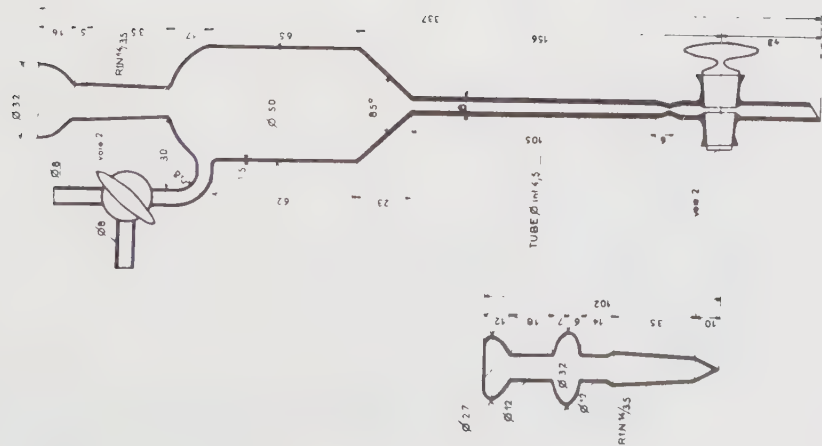


Fig. 30

Colonne de chromatographie avec son réservoir





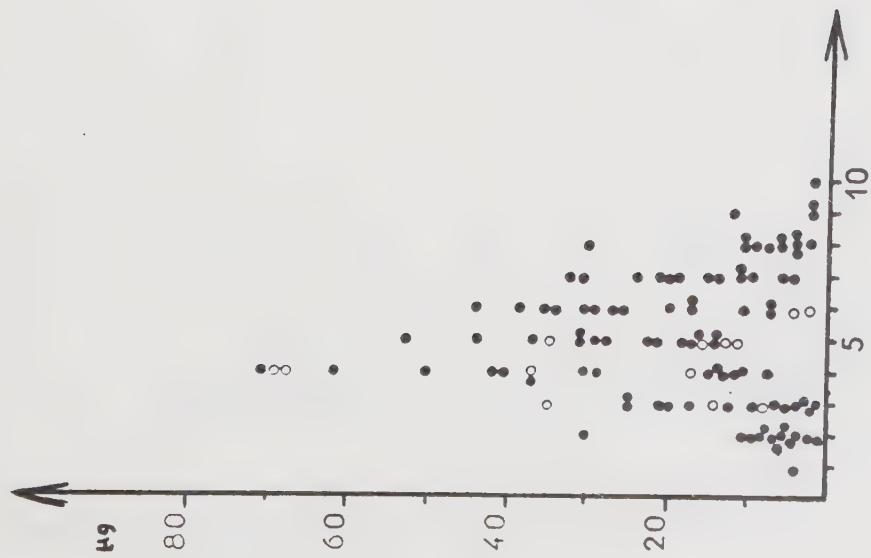


Fig. 32

Zone de passage de l'androstérone : ce corps passe entre le 3ème et le 5ème tubes avec un pic au 4ème. Dans l'extrait urinaire, cette zone est plus étalée surtout vers la gauche.

(O = androstérone pure - ● = extrait urinaire)

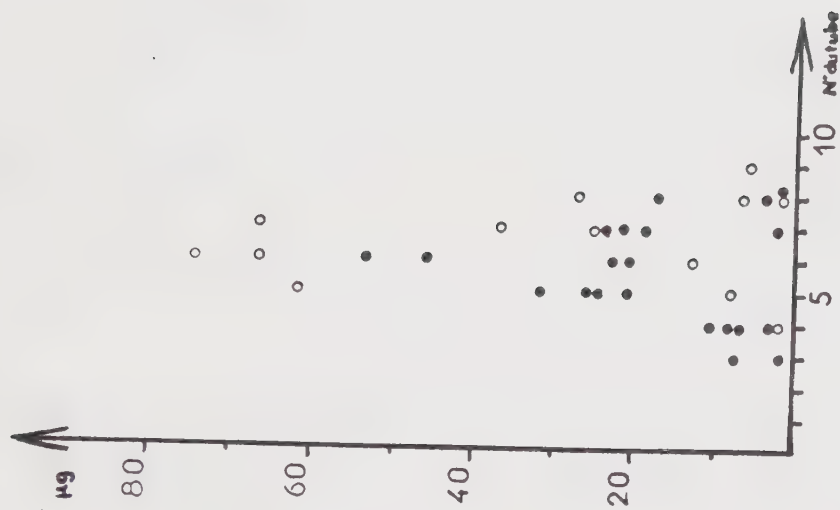


Fig. 33

Zone de passage de l'étiocolanolone : passage du 4ème au 9ème tubes. Pas de décalage vers la droite de l'extrait urinaire.

(O = étiocolanolone pure - ● = extrait urinaire).



18ème tube pour des quantités de 10 à 30 µg.

. Mélange de 11-céto-androstérone et de 11-céto-étiocholanolone  
le passage se fait du 13ème au 21ème tube pour des quantités  
de 80 à 110 µg.

c) Etude de l'élution des extraits urinaires.

Nous avons effectué une série de 12 chromatographies de  
pools urinaires (fig. 34). Dans la majorité des cas, la fraction  
A + E passe du 2ème au 8ème tube, pour des quantités de sté-  
roides de 80 à 180 µg. Les 17-cétostéroïdes oxygénés en 11  
commencent à passer au plus tôt dans le 11ème tube et au plus  
tard dans le 16ème tube, pour des quantités de stéroïdes de  
40 à 80 µg. La quantité totale de stéroïdes chromatographiés  
était de 130 à 250 µg en équivalent de DHA.

Dans le cas le plus défavorable, la fraction androsté-  
rone-étiocholanolone est éluée dans les 9 premiers tubes,  
c'est-à-dire par les 63 premiers ml de benzène hydraté à 0,1 %  
d'éthanol, les 17-cétostéroïdes oxygénés en 11 ne commençant  
à passer qu'à partir du 11ème tube.

En moyenne, l'intervalle de sécurité est de 28 ml avec  
des extrêmes allant de 15 à 50 ml.



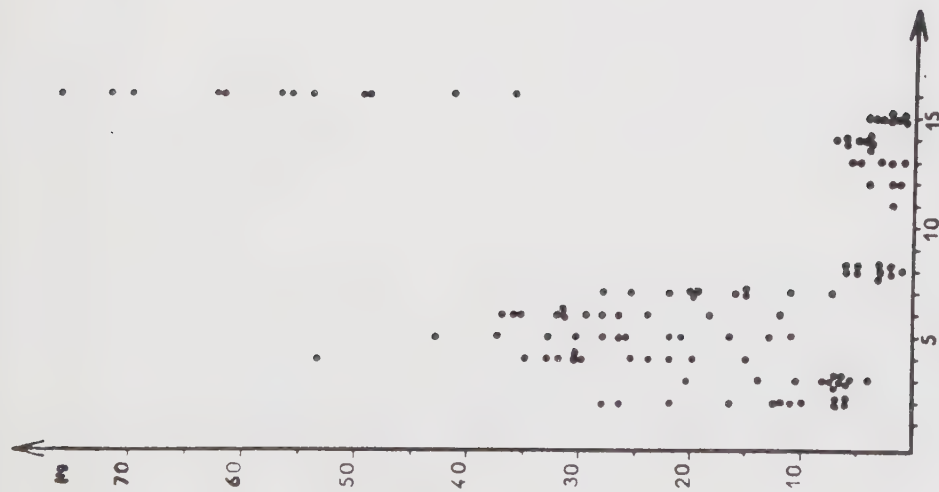


Fig. 34

Chromatographie de 12 pools de 3 urines. Séparation satisfaisante : le 9ème, le 10ème et généralement le 11ème tubes sont blancs. Le 16ème tube est élué par l'éthanol.

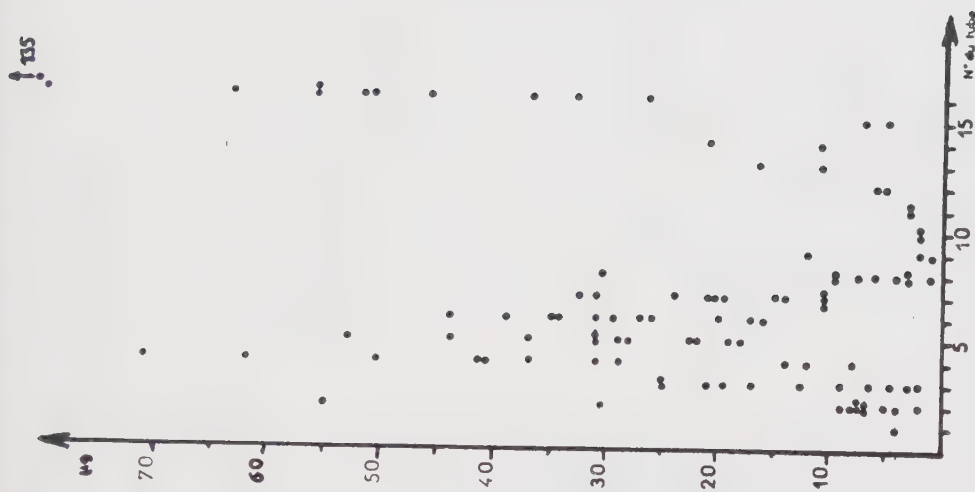


Fig. 35

Chromatographie de 11 urines. La séparation est satisfaisante, sauf dans un cas où l'on retrouve 2 µg de 11-cétoandrosterone dans la fraction A + E.



Nous avons obtenu des résultats semblables à partir d'urines isolées dans 11 cas (fig. 35). Dans la majorité des cas, la fin de l'élution de l'étiocholanolone se situe au 8ème tube, le début du passage des 17-cétostéroïdes 11-oxygénés au 16ème tube. Pour une quantité totale de stéroïdes variant de 120 à 330  $\mu\text{g}$ , l'intervalle de sécurité est en moyenne de 40 ml.

d) Exactitude de la méthode

Pour apprécier l'exactitude de la méthode, nous avons ajouté à différents échantillons d'extraits urinaires d'enfants (contenant très peu de 17-cétostéroïdes) des quantités d'androstérone de 40 à 150  $\mu\text{g}$ . La récupération a été de 93 % en moyenne (70 à 100 %). La même épreuve a été réalisée avec un mélange d'androstérone et d'étiocholanolone, donnant une récupération moyenne de 88 % (80 à 93 %). Dans l'ensemble, la moyenne a été de 91 % avec un  $\sigma$  de 10.

Il en résulte que la méthode remplit tout à fait les conditions que, selon MARRIAN (107) et BROWN (15), on doit exiger d'une méthode de dosage des stéroïdes.





e) Fidélité de la méthode.

Un certain nombre d'expériences a été pratiqué en double, ce qui nous a permis de calculer selon la formule de SNEDECOR :

$$S = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2N}} = 3,6 \text{ } \mu\text{g.}$$

f) Sensibilité de la méthode.

Les épreuves d'exactitude montrent que la récupération est voisine de 100 %, quand la quantité de stéroïdes atteint 80  $\mu\text{g}$ . Etant donné que la fraction A + E représente normalement plus de 70 % des 17-cétostéroïdes restants chez l'adulte, il suffit en pratique de chromatographier 100 à 200  $\mu\text{g}$  d'extrait. Chez l'enfant, ainsi que dans l'hypercorticisme, le pourcentage des 17-cétostéroïdes oxygénés en 11 étant de l'ordre de 50 %, il est alors préférable de partir de 200 à 300  $\mu\text{g}$  d'extrait.

g) Spécificité de la méthode.

Nous nous sommes efforcés de vérifier le plus souvent possible la pureté des différentes fractions par chromatographies sur papier. Pour ce faire, nous avons utilisé les sys-



tèmes préconisés par SAVARD (133) : ligroïne/propylène-glycol pour les 17-cétostéroïdes les moins polaires (DHA, androstérone, étiocholanolone), hexane-benzène/propylène-glycol pour les 17-cétostéroïdes oxygénés en 11 les plus polaires (11-céto-androstérone, 11-céto-étiocholanolone, 11-hydroxy-androstérone et 11-hydroxy-étiocholanolone).

Lors de la chromatographie d'extraits urinaires, nous avons prélevé chaque fois un aliquote des deux fractions que nous avons chromatographié sur papier. Nous avons constaté que la fraction A + E ne contenait aucune trace de 11-oxy 17-CS; inversement, nous n'avons pas trouvé d'étiocholanolone dans la fractions 11-oxy 17-CS.

### 3°) Discussion

#### a) Rapidité

Un technicien entraîné peut réaliser, si l'on ne tient pas compte du temps mis pour l'hydrolyse enzymatique, 12 fractionnements en 3 jours.

#### b) Volume d'éluant

Dans 85 % des chromatographies que nous avons pratiquées



avec cette méthode, la fraction A + E est éluée dans les 56 premiers ml de benzène hydraté à 0,1 % d'éthanol. Cependant, pour augmenter la sécurité de la méthode, nous avons décidé d'utiliser 70 ml d'éluant, alors que la technique de ZYGMUNTOWICZ utilise 260 ml de benzène, celle de HENRY 345 et celle de JOHNSEN 230.

c) Limites de la méthode.

L'intervalle de sécurité entre les deux fractions éluées dépend essentiellement du pourcentage des 11-cxy 17-CS et plus particulièrement de la 11-céto-androstérone.

Afin de mettre cette méthode à l'épreuve, nous avons ajouté à des pools d'urine des quantités relativement fortes de 11-céto-androstérone, soit seule (fig. 36), soit associée à la 11-hydroxy-étiocholanolone (fig. 37). Nous avons constaté que pour obtenir une séparation satisfaisante, il faut que la quantité de 11-céto-androstérone contenue dans l'échantillon à chromatographier ne dépasse pas 40 µg (soit 4 mg de 11-céto-androstérone pour 1000 ml d'urine). En fait, dans les extraits urinaires normaux, la quantité de 11-céto-androstérone ne dépasse jamais 1 mg par 24 heures, soit 7 % de la valeur des 17-cétostéroïdes totaux.



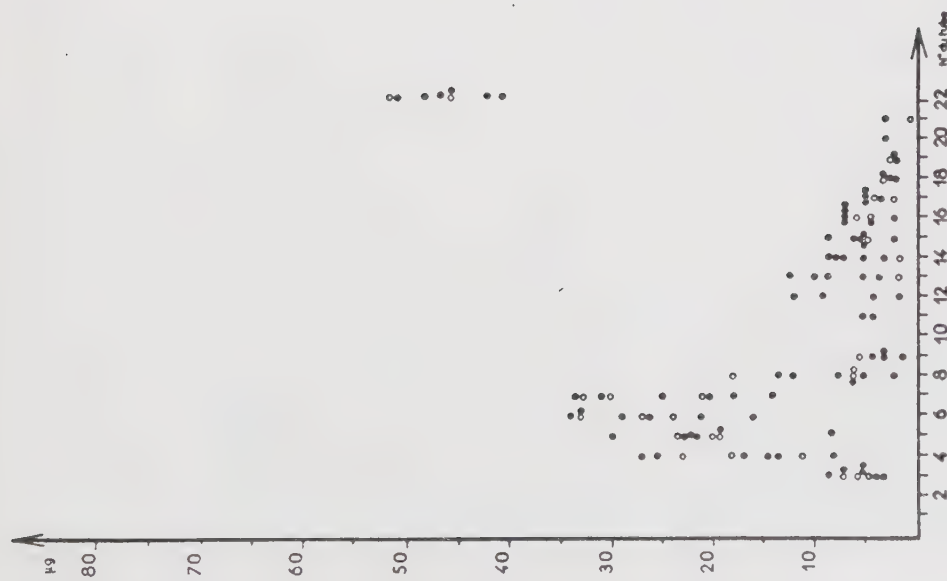


Fig. 36

L'adjonction de quantités importantes de 11-céto-androstérone à un pool urinaire ne gêne pas la séparation des deux principales fractions.  
(0 = Pool seul - ● = Pool + 11-cétoandrostérone)

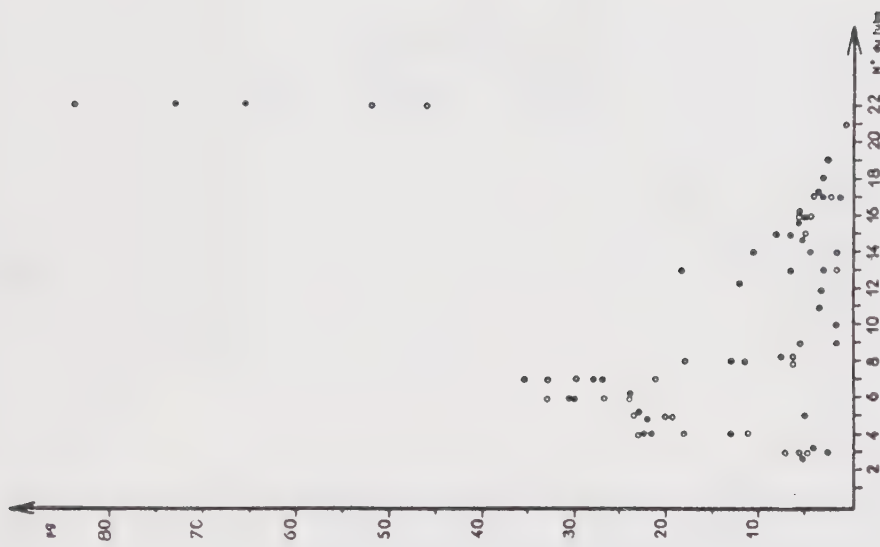


Fig. 37

L'adjonction de quantités importantes de 11-céto-androstérone et de 11β-hydroxy-étiocholanolone à un pool urinaire ne gêne pas la séparation des deux principales fractions.  
(0 = Pool seul - ● = Pool + 11 céto-androstérone + 11β-hydroxy-étiocholanolone)





En pathologie, il est très rare que le taux de la 11-céto-androstérone dépasse 3 mg par 24 heures. La 11-céto-étio-cholanolone et la 11 $\beta$ -hydroxy-androstérone sont en effet les 11-oxy 17-CS les plus importants. Il semble donc que dans tous les cas, du moins chez l'adulte, la méthode puisse être appliquée avec succès.

4°) Application de cette technique à une épreuve  
d'exploration dynamique du testicule endocrine

Depuis son élaboration, cette technique a été largement utilisée à la Fondation de Recherche en Hormonologie de l'Ecole de Puériculture.

Les renseignements les plus intéressants sont obtenus en comparant les valeurs statiques aux valeurs dynamiques, soit après freinage de la corticosurrénale par administration per os de 2,5 mg par jour pendant 5 jours du dérivé méthylé en 16 de la 9 $\alpha$ -fluoro-prédnisolone (dexaméthasone), soit par stimulation de la fonction gonadique par la gonadotropine chorionique (5.000 U.I. administrées par voie intramusculaire pendant 3 jours consécutifs), soit par une combinaison de ces deux méthodes (on administre pendant 8 jours consécutifs 2,5 mg de dexaméthasone per os. La gonadotropine est injectée par voie



intramusculaire au matin du 6ème, 7ème et 8ème jour). Les dosages urinaires sont réalisés avant et après l'épreuve.

Nous voudrions maintenant résumer très rapidement les résultats obtenus par ces différentes méthodes :

a) Chez le sujet normal.

Le freinage par la dexaméthasone provoque une chute des 17-cétostéroïdes totaux et de la fraction A + E qui tombe à une valeur voisine de 50 % de la valeur initiale et ceci en 3 jours en moyenne. Ce taux représente la fraction testiculaire des 17-cétostéroïdes urinaires; parallèlement, on observe une disparition quasi-totale de la DHA et des 11-oxy 17-CS dans les urines. La stimulation du testicule par 30.000 Unités de gonadotropine chorionique chez des hommes normaux, suivant la technique de JAYLE et al. (82), entraîne une élévation d'environ 50 %, tant des 17-cétostéroïdes totaux que de la fraction A + E. On n'observe aucune modification des taux de la DHA et des 11-oxy 17-CS.

Dans l'épreuve de stimulation sous freinage, on observe une élévation des 17-cétostéroïdes et de la fraction A + E qui reviennent à leur niveau de base.



b) Chez le sujet pathologique

Au cours des insuffisances testiculaires primitives dont la castration et l'agénésie testiculaire sont des exemples types, le freinage de la corticosurrénale fait pratiquement disparaître tant les 17-cétostéroïdes totaux que la fraction A + E et la stimulation par la gonadotropine chorionique ne provoque aucune élévation. Ces tests dynamiques se sont révélés d'un particulier intérêt au cours du syndrome de KLINEFELTER, où on observe très fréquemment, malgré des signes d'hypogonadisme, un taux de 17-cétostéroïdes normal par un mécanisme de compensation corticosurrénale. Ici aussi, on voit sous freinage, les 17-cétostéroïdes totaux et la fraction A + E s'effondrer alors que l'on n'observe aucune stimulation par la gonadotropine chorionique.

Au cours des insuffisances testiculaires secondaires, on observe en général une réponse sous gonadotropine chorionique, réponse dont l'intensité varie avec l'ancienneté de l'affection. Au cours de la gynécomastie, dans la majorité des cas d'étiologie pubertaire, au cours de la stérilité masculine ou de l'impuissance, les épreuves dynamiques sont en règle normales.



Chez le sujet âgé, on observe une réponse quasi normale à la gonadotropine chorionique, bien que les taux moyens tant des 17-cétostéroïdes totaux que de la fraction A + E soient inférieurs à ceux de l'adulte.





#### IV

#### CONCLUSIONS GENERALES



#### IV - CONCLUSIONS GENERALES

---

Le travail que nous présentons comporte trois chapitres qui couvrent la plus grande partie de nos connaissances actuelles sur les androgènes testiculaires.

Dans le premier chapitre consacré à la biogénèse de ces substances, nous avons rappelé les étapes historiques qui ont permis d'en comprendre les enchaînements métaboliques et surtout de montrer que dans ses grandes lignes, cette biogénèse était commune à toutes les glandes endocrines, compte tenu du fait que la prépondérance de certains enzymes oriente cette biogénèse dans un sens déterminé.

Les principales étapes de cette biogénèse sont :

1 - la transformation du cholestérol en prégnénolone, cette étape comportant deux hydroxylations successives en  $C_{20}$  et en  $C_{22}$  permettant un clivage de la chaîne latérale du cholestérol entre ces deux carbones.

2 - la transformation de la prégnénolone en progestérone qui est elle-même hydroxylée en 17, ce qui permet un nouveau clivage entre les carbones 17 et 20.



3 - la transformation de l'androstènedione en testostérone par réduction en 17, terme ultime de cette biogénèse. La testostérone, androgène le plus puissant, passe ensuite dans la circulation générale. La biosynthèse de cette hormone est sous la dépendance des hormones hypophysaires, ICSH essentiellement.

Notre contribution a porté en premier lieu sur l'étude de la première étape de cette biosynthèse; nous l'avons réalisée sous la direction du Docteur FORCHIELLI et du Docteur DORFMAN en collaboration avec K.M.J. MENON. Nous avons précisé les conditions optimales de l'activité du système enzymatique de clivage de la chaîne latérale du cholestérol dans les mitochondries du testicule de rat. L'ion  $\text{Ca}^{++}$ , qui provoque un gonflement des mitochondries, exerce un effet de stimulation appréciable, mais la présence d'ions  $\text{K}^+$  est nécessaire à une action maximale. Le pH optimum est de 7,4. Les tentatives de solubilisation de ce complexe enzymatique se sont soldées par un échec, montrant l'extrême fragilité de la protéine apoenzymatique.

Ces recherches préliminaires nous ont permis ensuite d'étudier le point d'impact des stimulines sur ce système enzymatique. Nous avons démontré que HCG et ICSH, qui augmentent de 3 à 6 fois le taux de clivage, exercent leur action stimulatrice sur l'hydroxylation en  $20\alpha$  du cholestérol qui représente



l'étape limitante de la biosynthèse de la testostérone testiculaire. FSH est beaucoup moins active que ICSH et son action est très probablement due à une contamination par ICSH. La testostérone par effet de rétro-inhibition freine cette séquence métabolique, mais son point d'action exact n'a pu être précisé.

Nous avons recherché ensuite s'il existait une autre voie de biogénèse de la testostérone à partir de la progestérone, court-circuitant la voie de la  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone et de l'androstènedione. Cette voie passerait par l'acétate de testostérone, intermédiaire hypothétique produit par peroxydation de la chaîne latérale de la progestérone. Cependant, si certains arguments en faveur de sa réalité ont pu être avancés, nous n'avons pu en réaliser la démonstration par isolement de l'acétate de testostérone. Les variations du rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de la testostérone produite à partir du cholestérol-4- $^{14}\text{C}$ , de la progestérone-7 $\alpha$ - $^3\text{H}$  et de la  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone-4- $^{14}\text{C}$  peuvent être mises sur le compte de différences dans la vitesse de pénétration de précurseurs radioactifs à travers la membrane mitochondriale.

Au cours de ces expériences, nous avons constaté que les mitochondries du testicule de rat n'étaient pas seulement capables de produire de la testostérone, mais aussi de la métaboliser grâce à la présence de réductases.





Dans le deuxième chapitre, consacré à l'étude de la testostérone dans les milieux biologiques, nous avons d'abord rappelé les différentes méthodes de dosage de la testostérone dans le plasma en insistant tout particulièrement sur le dosage par chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons ensuite décrit les différentes techniques de dosage du glucuronide de testostérone urinaire qui ont subi un développement considérable au cours de ces dernières années. Avec W. FUTTERWEIT et sous la direction du Docteur DORFMAN, nous avons été les premiers à appliquer la chromatographie en phase gazeuse à ce dosage. Nous en avons décrit en détail les différentes étapes et avons précisé les taux d'excrétion chez l'homme et chez la femme ainsi que dans certaines affections endocriniennes. Il est actuellement certain que les taux que nous avons présentés ne correspondent pas exactement à la testostérone, mais au couple testostérone-épitestostérone qui ne sont pas séparées par notre mode opératoire. Il a été démontré depuis que l'épitestostérone peut représenter 30 à 50 % des valeurs trouvées par cette méthode. Nous avons ensuite mis en évidence la présence de sulfate de testostérone urinaire dont le taux chez l'homme représente environ 5 à 10 % de la testostérone excrétée dans les urines. Il est probable que la quasi-totalité de cette conjugaison a lieu au niveau du foie.



Cependant, des recherches récentes permettent de penser qu'il existe une sulfoconjugaison testiculaire dans le cadre d'une voie des sulfates semblable à celle démontrée au niveau de la corticosurrénale. Il paraît cependant certain que cette voie est très secondaire dans le testicule alors qu'elle est prédominante dans la corticosurrénale.

Dans la troisième partie de notre travail, nous rappelons les grandes lignes du métabolisme de la testostérone. A côté du métabolisme principal qui conduit à l'androstérone et à l'étiocolanolone dont la majeure partie est excrétée sous forme de  $\beta$ -glucuronides, il existe deux autres voies secondaires: la première, qui fait suite à la précédente, transforme le carbonyl en 17 en une fonction alcool secondaire et le métabolite principal est le glucuronide de  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol; la deuxième conduit à la production d'un faible pourcentage de testostérone conjuguée, principalement à l'acide glucuronique.

Le but que nous avons poursuivi, sous la direction du Professeur JAYLE, est d'ordre analytique. Il a consisté à rechercher, dans un travail systématique, les conditions sélectives les plus rapides pour séparer et doser les trois principales fractions de 17-cétostéroïdes urinaires, c'est-à-dire la déhydroépiandrostérone, la fraction androstérone-étiocolanolone et les 17-cétostéroïdes oxygénés en 11. On sait que la



quasi-totalité de la déhydroépiandrosterone est excrétée sous la forme d'un sulfate qui peut être sélectivement hydrolysé par le procédé de COHEN et BITMAN à pH 4,7. Après extraction et dosage de ce 17-cétostéroïde, les formes conjuguées de l'androsterone et de l'étiocolanolone sont hydrolysées par la  $\beta$ -glucuronidase et la sulfatase d'Helix Pomatia. On fait ensuite passer l'extrait sur une colonne d'alumine. La fraction androsterone-étiocolanolone est éluée par du benzène hydraté à 0,1 % d'éthanol et la fraction plus polaire contenant les 11-oxy 17-cétostéroïdes par du benzène à 4 % d'éthanol. Les conditions opératoires ont été rigoureusement standardisées.

Cette méthode de fractionnement rapide des 17-cétostéroïdes urinaires est utilisée pour évaluer la fraction androgène secrétée par les cellules de Leydig du testicule, selon deux méthodes d'exploration fonctionnelle qui ont été mises au point dans le laboratoire du Professeur M.F. JAYLE. La plus rigoureuse consiste à supprimer les 17-cétostéroïdes d'origine corticosurrénale par la dexaméthasone et à mesurer la fraction androsterone-étiocolanolone après administration de gonadotropine chorionique. Le testicule a, dans ces conditions, la propriété d'accroître l'excrétion de l'androsterone et de l'étiocolanolone et la dénivellation de ces deux stéroïdes permet une bonne appréciation de l'activité androgène normale et pathologique des gonades.



BIBLIOGRAPHIE





BIBLIOGRAPHIE

1. AAKVAAG (A.), HAGEN (A.A.), EIK-NES (K.B.)  
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 86, 622
2. ADAMS (J.B.)  
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 82, 577
3. ALLEN (W.M.), HAYWARD (S.J.), PINTO (A.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1950, 10, 54
4. BAULIEU (E.-E.)  
Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1961, 6, 533
5. BITMAN (J.), COHEN (S.L.)  
J. Biol. Chem., 1951, 191, 351
6. BLOCH (K.), BOREK (E.), RITTENBERG (D.)  
J. Biol. Chem., 1946, 162, 441
7. BOWERS (A.), HALSALL (T.G.), JONES (E.R.H.), LEMIN (A.J.)  
J. Chem. Soc., 1953, 2548
8. BOWERS (A.), HOLTON (P.G.), NECOECHEA (E.), KINCL (F.A.)  
J. Chem. Soc., 1961, 4057
9. BRADY (R.O.)  
J. Biol. Chem., 1951, 193, 145
10. BRINCK-JOHNSSEN (T.), EIK-NES (K.B.)  
Endocrinol., 1957, 61, 676
11. BROCKMAN (H.), SCHODDER (H.)  
Ber., 1941, 74, 73



12. BROOKS (R.V.)  
Steroids, 1964, 4, 117
13. BROOKS (R.V.), GIULIANI (G.)  
Steroids, 1964, 4, 101
14. BROUHA (L.), SIMONNET (H.)  
C. R. Soc. Biol., 1928, 99, 41
15. BROWN (J.B.), BULBROOK (R.D.), GREENWOOD (F.C.)  
J. Endocrinol., 1957, 16, 41
16. BROWNIE (A.C.), VAN DER MOLEN (H.J.), NISHIZAWA (E.E.),  
EIK-NES (K.B.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1964, 24, 1091
17. BURGER (H.G.), KENT (J.R.), KELLIE (A.E.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1964, 24, 432
18. BURSTEIN (S.), LIEBERMAN (S.)  
J. Biol. Chem., 1958, 233, 331
19. BUTENANDT (A.)  
Z. Angew. Chem., 1931, 44, 905
20. BUTENANDT (A.), HANISCH (G.)  
Z. Physiol. Chem., 1935, 237, 89
21. CALLOW (N.H.), CALLOW (R.K.)  
Biochem. J., 1939, 33, 931
22. CAMACHO (A.M.), MIGEON (C.J.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1963, 23, 301
23. CAMACHO (A.M.), MIGEON (C.J.)  
J. Clin. Invest., 1964, 43, 1083



24. CARTENSEN (N.C.H.)  
Acta Soc. Med. Upsalensis, 1961, 66, 129
25. CONSTANTOPOULOS (G.), TCHEN (T.T.)  
J. Biol. Chem., 1961, 236, 65
26. DAVID (K.), DINGEMANSE (E.), FREUD (J.), LAQUEUR (E.)  
Z. Physiol. Chem., 1935, 233, 281
27. DE NICOLA (A.F.), DORFMAN (R.I.), FORCHIELLI (E.)  
Steroids, 1966, 7, 351
28. DESSYPRIS (A.), DROSDOWSKY (M.A.), Mc NIVEN (N.L.),  
DORFMAN (R.I.)  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 121, 1128
29. DEVIS (R.)  
Réunion des Endocrinologistes de Langue Française  
1951, p. 187
30. DINGEMANSE (E.), HUIS IN'T VELD (L.G.), DE LAAT (B.M.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1946, 6, 535
31. DINGEMANSE (E.), HUIS IN'T VELD (L.G.), HARTOGH-KATZ (S.L.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1952, 12, 66
32. DIXON (R.), VINCENT (V.), KASE (N.)  
Steroids, 1965, 6, 757
33. DOBRINER (K.)  
J. Clin. Invest., 1953, 32, 940
34. DOBRINER (K.), LIEBERMAN (S.), RHOADS (C.P.)  
J. Biol. Chem., 1948, 172, 241



35. DOHRN (M.)  
Klin. Wchnschr., 1927, 6, 359
36. DORFMAN (R.I.)  
Communication personnelle 1966
37. DRAY (F.), LEDRU (M.J.)  
C. R. Acad. Sci. Paris, 1966, 262, 679
38. DROSDOWSKY (M.A.), SCHOLLER (R.), JAYLE (M.F.)  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 1055
39. DROSDOWSKY (M.A.)  
Thèse de Médecine Paris, 1962
40. DROSDOWSKY (M.A.), MENON (K.M.J.), FORCHIELLI (E.),  
DORFMAN (R.I.)  
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 104, 229
41. EDWARDS (R.W.H.), KELLIE (A.E.)  
Chem. et Industr., 1956, p. 250
42. EIK-NES (K.B.)  
Endocrinol., 1962, 71, 101
43. EIK-NES (K.B.), HALL (P.F.)  
Proc. Soc. Exp. Biol., 1962, 111, 280
44. EIK-NES (K.B.), KEKRE (M.)  
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 78, 449
45. ENGEL (L.L.), WARD (M.G.)  
Abstract n° 213, Second International Congress on  
Hormonal Steroids, Milano, May-23-28, 1966





46. EXLEY (D.)  
Abstract n° 172, Second International Congress on  
Hormonal Steroids, Milano, May 23-28, 1966
47. FELLNER (O.O.)  
Arch. Ges. Physiol., 1921, 189, 199
48. FINKELSTEIN (M.)  
Acta Endocrinol., 1952, 10, 149
49. FINKELSTEIN (M.), FORCHIELLI (E.), DORFMAN (R.I.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1961, 21, 98
50. FISHMAN (W.H.), SIE (H.B.)  
J. Biol. Chem., 1956, 219, 335
51. FONKEN (G.S.), MURRAY (H.C.), REINEKE (L.M.)  
J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 5507
52. FORCHIELLI (E.), DORFMAN (R.I.)  
J. Biol. Chem., 1956, 233, 443
53. FORCHIELLI (E.), GUT (M.), DORFMAN (R.I.)  
Abstract of the 43<sup>rd</sup> Meeting of the Endocrine Society, 1961
54. FORCHIELLI (E.), SORCINI (G.), NIGHTINGALE (M.), BRUST (N.),  
DORFMAN (R.I.), PERLOFF (W.M.), JACOBSON (G.)  
Anal. Biochem., 1963, 5, 416
55. FUKUSHIMA (D.K.), BRADLOW (H.L.), DOBRINER (K.), GALLAGHER (T.F.)  
J. Biol. Chem., 1954, 206, 863
56. FUTTERWEIT (W.), Mc NIVEN (N.L.), NARCUS (L.), LANTOS (C.)  
DROSDOWSKY (M.A.), DORFMAN (R.I.)  
Steroids, 1963, 1, 628



57. FUTTERWEIT (W.), Mc NIVEN (N.L.), GUERRA-GARCIA (R.),  
GIBREE (N.), DROSDOWSKY (M.A.), SIEGEL (G.L.), SOFFER (L.J.),  
ROSENTHAL (I.M.), DORFMAN (R.I.)  
Steroids, 1964, 4, 137
58. FUTTERWEIT (W.), SIEGEL (G.L.), FREEMAN (R.), GRIBOFF (S.I.),  
DROSDOWSKY (M.A.), GIBREE (N.), DORFMAN (R.I.), SOFFER (L.J.)  
Gas chromatography of steroids in biological fluids.  
1965, p. 19 (M.B. LIPSETT, ed., Plenum Press, N.Y.)
59. GAYLOR (J.L.), SU-CHEN TSAI  
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 84, 739
60. GLOCK (G.E.), Mc LEAN (P.)  
Biochem. J., 1955, 61, 381
61. GOSPODAROWICZ (D.), LEGAULT-DEMARE (J.)  
C. R. Acad. Sci. Paris, 1962, 255, 3047
62. GREEN (D.E.)  
J. Biol. Chem., 1963, 238, 975
63. GUERRA-GARCIA (R.), CHATTORAJ (S.C.), GABRILOVE (L.J.),  
WOTIZ (H.H.)  
Steroids, 1963, 2, 605
64. HAGEN (A.A.), EIK-NES (K.B.)  
Fed. Proceed., 1963 (avril), p. 330
65. HALKERSTON (D.K.), EICHORN (J.), HECHTER (O.)  
Arch. Biochem. Biophys., 1959, 85, 287
66. HALL (P.F.)  
Endocrinol., 1965, 76, 396



67. HALL (P.F.), EIK-NES (K.B.)  
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 411
68. HALL (P.F.), EIK-NES (K.B.)  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1963, 114, 791
69. HAYNES (R.C.), BERTHET (L.)  
J. Biol. Chem., 1957, 225, 115
70. HAYNES (R.C.), KORITZ (S.B.), PERON (F.G.)  
J. Biol. Chem., 1959, 234, 1421
71. HELLMAN (L.), BRADLOW (H.L.), ZUMOFF (B.), FUKUSHIMA (D.K.),  
GALLAGHER (T.F.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1959, 19, 936
72. HENRY (R.)  
Hormonologie Surrénale. Monog. Annuelle, Soc. Biol. Clin.,  
1965, 10, 3
73. HENRY (R.), THEVENET (M.)  
Ann. Endocr., 1953, 14, 628
74. HESSE (G.), DANIEL (I.), WOHLLEBEN (G.)  
Angew. Chem., 1952, 64, 103
75. HOKIN (L.E.), HOKIN (M.R.)  
Scient. Amer., 1965, 213, 78
76. HOLLANDER (N.), HOLLANDER (V.P.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1958, 18, 966
77. HUDSON (B.), COGHLAN (J.), DULMANIS (A.), WINTOUR (M.),  
EKKEL (I.)  
Austral. J. Exp. Biol., 1963, 41, 235



78. IBAYASHI (H.), NAKAMURA (M.), MURAKAWA (S.), UCHIKAWA (T.),  
TANIOKA (T.), NAKAO (K.)  
Steroids, 1964, 3, 559
79. ICHII (S.), FORCHIELLI (E.), DORFMAN (R.I.)  
Steroids, 1963, 2, 631
80. JAYLE (M.F.), CREPY (O.), SCHOLLER (R.)  
Sem. Hôp. Paris (Arch. Biol. Med.), 1957, 33, n°4
81. JAYLE (M.F.), MALASCIS (D.)  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 1349
82. JAYLE (M.F.), SCHOLLER (R.), SFIKAKIS (A.), HERON (M.)  
Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 212
83. JOHNSON (S.G.)  
Acta Endocrinol., 1956, 21, 127
84. JOHNSON (D.F.), HEFTMANN (E.), FRANCOIS (D.)  
J. Chromatog., 1960, 4, 446
85. KANHT (F.W.), NEHER (R.), SCHMID (K.), WETTSTEIN (A.)  
Experientia, 1961, 17, 19
86. KASE (N.), FORCHIELLI (E.), DORFMAN (R.I.)  
Acta Endocrinol., 1961, 37, 19
87. KASE (N.), KOWAL (J.), SOFFER (L.J.)  
Acta Endocrinol., 1963, 44, 8
88. KASE (N.), KOWAL (J.), PERLOFF (W.), SOFFER (L.J.)  
Acta Endocrinol., 1963, 44, 15





89. KELLIE (A.E.), WADE (A.P.)  
Biochem. J., 1957, 66, 196
90. KIRSCHNER (M.A.), LIPSETT (M.B.), COLLINS (D.R.)  
J. Clin. Invest., 1965, 44, 657
91. KLIMAN (B.)  
Symposium sur la Chromatographie gazeuse des Stéroïdes  
Glasgow, Avril 1966
92. KOENIG (V.L.), MELZER (F.), SZEGO (C.M.), SAMUELS (L.T.)  
J. Biol. Chem., 1941, 141, 487
93. KORENMAN (S.G.), DAVIS (T.E.), WILSON (H.), LIPSETT (M.B.)  
Steroids, 1964, 3, 203
94. KORENMAN (S.G.), WILSON (H.), LIPSETT (M.B.)  
J. Clin. Invest., 1963, 42, 1753
95. KORITZ (S.B.)  
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 56, 63
96. KORITZ (S.B.), PERON (F.G.)  
J. Biol. Chem., 1959, 234, 3122
97. LAKSHMANAN (T.K.), LIEBERMAN (S.)  
Arch. Biochem. Biophys., 1954, 53, 258
98. LAQUEUR (E.), DINGEMANSE (E.), HART (P.C.), de JONGH (S.E.)  
Klin. Wschnschr., 1927, 6, 1859
99. LIM (N.Y.), BROOKS (R.V.)  
Steroids, 1965, 6, 561



100. LIM (N.Y.), DINGMAN (J.F.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1965, 25, 563
101. LINDNER (H.R.)  
Nature, 1959, 183, 1605
102. LINDNER (H.R.)  
J. Endocrinol., 1961, 22, 139
103. LUCAS (L.M.), WHITMORE (W.F.), WEST (C.D.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1957, 17, 465
104. LUUKKAINEN (T.), VANDENHEUVEL (W.J.A.), HAATI (E.O.A.),  
HORNING (E.C.)  
Biochim. Biophys. Acta, 1961, 52, 599
105. LYNN (W.S.), BROWN (R.H.)  
J. Biol. Chem., 1958, 232, 1015
106. MACCHI (I.A.), HECHTER (O.)  
Arch. Biochem. Biophys., 1964, 53, 305
107. MARRIAN (G.F.)  
Conférences et rapports du 3ème Congrès International  
de Biochimie de Bruxelles, 1955, 511
108. MARTI (M.)  
Helv. Med. Acta, 1951, 18, 215
109. MASON (N.R.), SAMUELS (L.T.)  
Endocrinol., 1961, 68, 898
110. Mc GEE (L.C.)  
Proc. Inst. Med. Chicago, 1927, 6, 242



111. Mc GUIRE (J.S.), TOMKINS (G.M.)  
J. Biol. Chem., 1960, 235, 1634
112. Mc NIVEN (N.D.), FUTTERWEIT (W.), BERENKEY (K.M.)  
Résultats non publiés
113. MENON (K.M.J.), DROSDOWSKI (M.A.), DORFMAN (R.I.),  
FORCHIELLI (E.)  
Steroids, 1965, suppl. I, p. 95
114. MENON (K.M.J.), DORFMAN (R.I.), FORCHIELLI (E.)  
Steroids, 1965, suppl. II, p. 165
115. MOORE (C.R.)  
Am. J. Anat., 1924, 34, 269
116. OERTEL (G.W.)  
Acta Endocrinol., 1960, 37, 237
117. OSINSKI (P.), VANDERHAEGHE (H.)  
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1960, 79, 216
118. PERON (F.G.), KORITZ (S.B.)  
J. Biol. Chem., 1958, 233, 256
119. PLANTIN (L.O.), BIRKE (G.)  
Acta Med. Scand., 1954, suppl. 291-296, p. 5
120. POND (M.H.)  
Lancet, 1951, 2, 200
121. RIONDEL (A.), TAIT (J.F.), GUT (M.), TAIT (S.A.S.),  
JOACHIM (E.), LITTLE (B.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1963, 23, 620



122. ROBEL (P.), EULIOZZI (R.), BAULIEU (E.-E.)  
J. R. Acad. Sci. Paris, 1965, 261, 4886
123. ROBINSON (A.M.), GOULDEN (F.)  
Brit. J. Cancer, 1941, 2, 62
124. ROSNER (J.M.), CONTE (N.F.), BRIGGS (J.H.), CHAO (P.Y.),  
SUDMAN (E.), FORCHAM (P.H.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1965, 25, 95
125. ROSNER (J.M.), HALL (P.F.), EIK-NES (K.B.)  
Steroids, 1964, 5, 199
126. ROSNER (J.M.), MORITA (S.), FORCHAM (P.H.)  
Endocrinol., 1964, 75, 299
127. RUZICKA (L.), PRELOG (V.)  
Helv. Chim. Acta, 1943, 26, 975
128. RYAN (K.J.)  
J. Biol. Chem., 1959, 234, 268
129. SALOKANGAS (R.A.), RILLING (H.C.), SAMUELS (L.T.)  
Biochem., 1965, 4, 1506
130. SAMUELS (L.T.)  
J. Biol. Chem., 1947, 168, 471
131. SAMUELS (L.T.), HELMREICH (M.L.)  
J. Biol. Chem., 1956, 58, 435
132. SAMUELS (L.T.), HELMREICH (M.L.), LASATER (M.B.), REICH (H.)  
Science, 1951, 113, 490





133. SAVARD (A.)  
J. Biol. Chem., 1953, 1, 457
134. SAVARD (K.), DORFMAN (R.I.), POUTASKE (E.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1952, 12, 935
135. SAVARD (K.), GOLDBLUM (J.W.)  
Endocrinol., 1960, 66, 617
136. SCHONBAUM (E.)  
Rev. Canad. Biol., 1964, 12, 495
137. SCHUBERT (K.), WEHRBERGER (K.)  
Naturwissenschaften, 1960, 47, 281
138. SEKI (T.), MATSUMOTO (K.)  
J. Chromatog., 1963, 10, 400
139. SHARMA (D.)  
Communication personnelle
140. SHIKITA (M.), TAMAOKI (B.)  
Endocrinol., 1965, 76, 563
141. SHIKITA (M.), TAMAOKI (B.)  
Biochem., 1965, 4, 1189
142. SHIKITA (M.), KAKISAKI (H.), TAMAOKI (B.)  
Steroids, 1964, 4, 521
143. SHIMIZU (K.), HAYANO (M.), GUT (M.), DORFMAN (R.I.)  
J. Biol. Chem., 1961, 236, 695
144. SLAUNWHITE (W.R.), SAMUELS (L.T.)  
J. Biol. Chem., 1956, 220, 341



145. SLAUNWHITE (W.R.), SANDBERG (A.A.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1958, 18, 1056
146. SRERE (P.A.), CHAIKOFF (J.L.), TREITMAN (S.S.), BURSTEIN (S.)  
J. Biol. Chem., 1950, 182, 629
147. STAIB (W.), OTT (D.), PELZER (H.)  
Acta Endocrinol., 1958, 28, 311
148. STAIB (W.), SHILD (W.)  
Klin. Wchschr., 1958, 36, 166
149. STONE (D.), HECHTER (O.)  
Arch. Biochem. Biophys., 1963, 51, 457
150. SU-CHEN TSAI, YING (B.P.), GAYLOR (J.L.)  
Arch. Biochem. Biophys., 1964, 105, 329
151. SUZUKI (Y.), ETO (T.)  
Japan. J. Anim. Reprod., 1962, 7, 163
152. SUZUKI (Y.), ETO (T.)  
Endocrinol. Japan., 1962, 9, 277
153. SUZUKI (Y.), ETO (T.), MASUDA (H.)  
Japan. J. Anim. Reprod., 1962, 8, 41
154. TAGMANN (E.), PRELOG (V.), RUZICKA (L.H.)  
Chem. Abst., 1946, 29, 440
155. TALALAY (P.)  
Biochim. Biophys. Acta, 1951, 18, 300
156. TOREN (D.), MENON (K.M.J.), FORCHIELLI (E.), DORFMAN (R.I.)  
Steroids, 1964, 3, 381



157. VANDENHEUVEL (W.J.A.), SWEELEY (C.C.), HORNING (E.C.)  
J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 3481
158. VERMEULEN (A.), VERPLANCKE (J.C.M.)  
Steroids, 1963, 2, 453
159. VESTERGAARD (P.), CLAUSSEN (B.)  
Acta Endocrinol., 1962, suppl. 64, p. 3
160. VOIGT (K.D.), VOLKWEIN (U.), TAMM (J.)  
Klin. Wchschr., 1964, 13, 642
161. WEST (C.D.), HOLLANDER (V.P.), KRITCHEVSKY (T.H.), DOBRINER (K.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1952, 12, 915
162. ZONDEK (B.)  
Nature, 1934, 13, 209
163. ZURBRUGG (R.P.), JACOBS (R.D.B.), GARDNER (L.I.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1965, 25, 315
164. ZYGMUNTOWICZ (A.S.), WOOD (M.), CHRISTO (E.), TALBOT (N.B.)  
J. Clin. Endocr. Metab., 1951, 11, 578



TABLE DES MATIERES





# ETUDE BIOCHIMIQUE ET METABOLIQUE DES ANDROGENES TESTICULAIRES

## TABLEAU DES ABREVIATIONS

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I - <u>BIOGENESE DES ANDROGENES TESTICULAIRES</u>                                                                                       | 1  |
| A) <u>HISTORIQUE</u>                                                                                                                    | 2  |
| 1°) Mise en évidence des stéroïdes par des méthodes biologiques et chimiques                                                            | 2  |
| 2°) Détermination des stéroïdes de la veine spermatique après perfusion de substances marquées                                          | 5  |
| 3°) Etude du métabolisme des androgènes au moyen de coupes de tissu, d'homogénats et de fractions subcellulaires de testicule           | 6  |
| 4°) Action des gonadotropines sur le tissu testiculaire                                                                                 | 10 |
| 5°) Conclusions                                                                                                                         | 13 |
| B) <u>CONTRIBUTION PERSONNELLE</u>                                                                                                      | 19 |
| 1°) Etude du système enzymatique de clivage de la chaîne latérale du cholestérol au niveau des mitochondries de testicules de rat       | 19 |
| a) Introduction                                                                                                                         | 19 |
| b) Matériel et procédure expérimentale                                                                                                  | 20 |
| c) Résultats                                                                                                                            | 23 |
| 1. Caractéristiques du système enzymatique                                                                                              | 23 |
| 2. Action des gonadotropines chorionique (HCG) et hypophysaires (FSH et ICSH)                                                           | 39 |
| 2°) Recherches sur une nouvelle voie de biosynthèse de la testostérone dans le tissu testiculaire de rat                                | 54 |
| a) Introduction                                                                                                                         | 54 |
| b) Matériel et méthode                                                                                                                  | 56 |
| c) Résultats                                                                                                                            | 57 |
| 1. Incubation de la préparation mitochondriale avec du cholestérol-4- <sup>14</sup> C et de la progestérone-7 $\alpha$ - <sup>3</sup> H | 57 |



|                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2. Incubation de la préparation mitochondriale avec de la progestérone- $7\alpha$ - $^3\text{H}$ et de la $17\alpha$ -hydroxyprogestérone-4- $^{14}\text{C}$ | 67  |
| 3. Incubation de la préparation mitochondriale soit avec de la testostérone soit avec de l'androstènedione marquée au $^{14}\text{C}$                        | 77  |
| 4. Mesure de la consommation de NADPH par la préparation mitochondriale                                                                                      | 82  |
| d) Discussion                                                                                                                                                | 83  |
| <br>II - <u>LA TESTOSTERONE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES</u>                                                                                                 | 92  |
| A) <u>HISTORIQUE</u>                                                                                                                                         | 93  |
| 1 <sup>o</sup> ) Dosage de la testostérone plasmatique                                                                                                       | 93  |
| 2 <sup>o</sup> ) Dosage de la testostérone urinaire                                                                                                          | 99  |
| B) <u>CONTRIBUTION PERSONNELLE</u>                                                                                                                           | 104 |
| 1 <sup>o</sup> ) Dosage de la testostérone urinaire par chromatographie en phase gazeuse                                                                     | 104 |
| a) Matériel                                                                                                                                                  | 104 |
| b) Méthode                                                                                                                                                   | 106 |
| c) Résultats                                                                                                                                                 | 110 |
| d) Discussion                                                                                                                                                | 122 |
| 2 <sup>o</sup> ) Mise en évidence de sulfate de testostérone dans les urines                                                                                 | 132 |
| a) Introduction                                                                                                                                              | 132 |
| b) Matériel                                                                                                                                                  | 133 |
| c) Méthode                                                                                                                                                   | 133 |
| d) Résultats                                                                                                                                                 | 136 |
| e) Discussion                                                                                                                                                | 137 |



|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III - <u>ETUDE DES METABOLITES URINAIRES DE LA TESTOSTERONE</u>                        | 140 |
| A) <u>HISTORIQUE</u>                                                                   | 141 |
| 1°) Métabolisme de la testostérone                                                     | 141 |
| a) Réduction directe de la testostérone (voie des diols)                               | 143 |
| b) Réduction indirecte de la testostérone                                              | 145 |
| c) Formation de glucuronide de testostérone                                            | 149 |
| d) Formation d'oestrogènes                                                             | 150 |
| 2°) Technique de séparation des métabolites urinaires par chromatographie d'adsorption | 152 |
| B) <u>CONTRIBUTION PERSONNELLE</u>                                                     | 155 |
| 1°) Méthode                                                                            | 156 |
| a) Recueil des urines et hydrolyse                                                     | 156 |
| b) Extraction de la déhydroépiandrostérone libérée                                     | 157 |
| c) Hydrolyse enzymatique des 17-cétostéroïdes conjugués restants                       | 158 |
| d) Extraction des 17-cétostéroïdes libérés                                             | 159 |
| e) Chromatographie                                                                     | 160 |
| f) Dosage des fractions A + E et 11-oxy 17-CS                                          | 163 |
| g) Calcul des résultats                                                                | 163 |
| 2°) Recherches expérimentales                                                          | 164 |
| a) Standardisation de l'alumine                                                        | 164 |
| b) Etude de l'élution des corps purs                                                   | 166 |
| c) Etude de l'élution des extraits urinaires                                           | 169 |
| d) Exactitude de la méthode                                                            | 171 |
| e) Fidélité de la méthode                                                              | 172 |
| f) Sensibilité de la méthode                                                           | 172 |
| g) Spécificité de la méthode                                                           | 172 |



|                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3°) Discussion                                                                | 173 |
| a) Rapidité                                                                   | 173 |
| b) Volume d'éluant                                                            | 173 |
| c) Limites de la méthode                                                      | 174 |
| 4°) Application de cette technique dans une épreuve<br>dynamique du testicule | 176 |
| a) Chez le sujet normal                                                       | 177 |
| b) Chez le sujet pathologique                                                 | 178 |
| IV - <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>                                             | 180 |
| <u>BIBLIOGRAPHIE</u>                                                          | 187 |
| <u>TABLE DES MATIERES</u>                                                     | 204 |





D E U X I E M E    T H E S E

---

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

"Principe de la chromatographie gaz-liquide avec  
détection par capture d'électrons et application  
à la détermination des stéroïdes"

Vu et approuvé :

Orsay, le 16 Mai 1967

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. BERGERARD

Vu

et Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie

de Paris,

J. ROCHE









